

**HÄMOGLOBIN A₂ IM NABELSCHNURBLUT
VON NEU - BZW. FRÜHGEBORENEN**

PATRICIA NEUMEYER

1986

Aus der Kinderklinik im Dr. von Haunerschen
Kinderspital der

U N I V E R S I T Ä T M Ü N C H E N

(Vorstand: Prof. Dr. B. H. Hadorn)

HÄMOGLOBIN A₂ IM NABELSCHNURBLUT VON NEU- BZW.
FRÜHGEBORENEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Patricia Neumeyer

München
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Betke

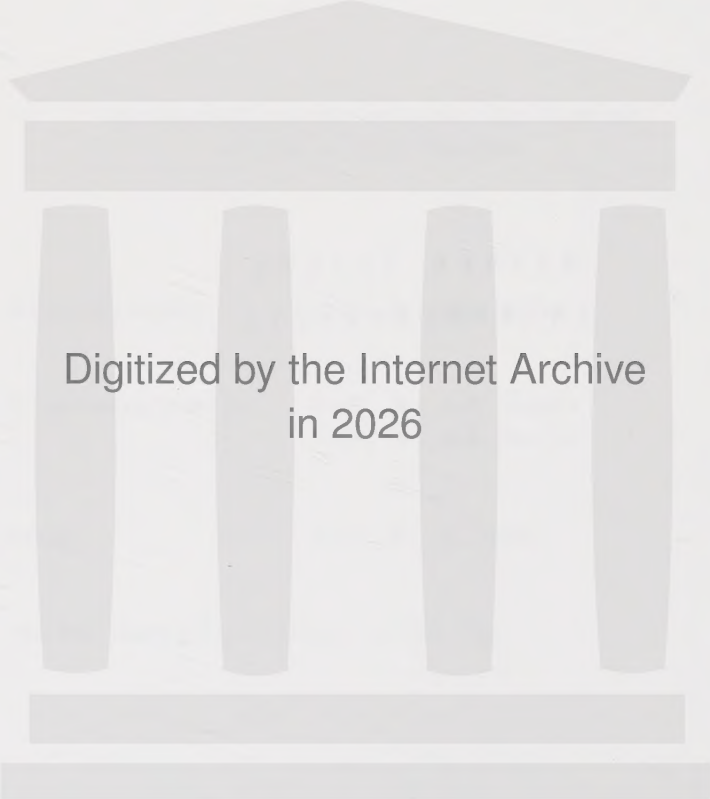
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hadorn
Prof. Dr. med. Murken

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.1987

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0092

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. E I N L E I T U N G	1
1.1 Eigene Fragestellung	3
2. P R O B A N D E N / M A T E R I A L / M E T H O D E	5
2.1 Untersuchte Kinder bzw. Probanden	5
2.2 Blutproben	5
2.3 Hämolysatherstellung	6
2.4 Hb-Messung	6
2.5 HbF-Messung	7
2.6 Methode der chromatographischen Auftrennung der Hämolysate	8
2.6.1 Herstellung der Puffer	8
2.6.2 Cellulose-Präparation	8
2.6.3 Beschickung der Säulen	9
2.6.4 Chromatographie	9
2.6.5 Berechnung von HbA ₂ und HbA / HbF	10
2.7 Nachweis von HbA ₂ / HbA und HbF in den Eluaten	10
2.8 Methodenkritische Diskussion	12
2.9 Wahl der Methode	14
3. E R G E B N I S S E	15
3.1 Erwachsenen Vergleichspopulation	15
3.2 Entwicklung der einzelnen Hb-Fraktionen mit zu- nehmender Reife des Kindes	16
3.2.1 HbA-Entwicklung	16
3.2.2 HbF-Entwicklung	18
3.2.3 HbA ₂ -Entwicklung	18
3.3 Verhältnis von HbA ₂ zu den anderen Fraktionen	23
3.3.1 HbA ₂ zu HbA	23
3.3.2 HbA ₂ zu HbF	23
3.4 Verhältnis der Fraktionen zueinander mit zuneh- mendem Alter bzw. Reife des Kindes	26
3.5 Befunde der 26. SSW	34

4. D I S K U S S I O N	35
4.1 Einleitung	35
4.2 Vergleich eigener Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur	36
4.2.1 HbF und HbA	36
4.2.2 HbA ₂	40
4.2.3 Verhältnis HbA / HbA ₂ während der Fetalzeit	41
4.2.4 Verhältnis von HbF zu HbA ₂	42
4.2.5 Abhängigkeit des HbA ₂ von der Reife des Kindes	42
4.3 Zum Problem der Regulation der Gen-Expression	44
4.3.1 Einleitung	44
4.3.2 Bisherige Hypothesen	47
4.3.3 Diskussion der Modelle unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse	53
4.4 Die materno-fetale Transfusion als Störfaktor	55
5. Z U S A M M E N F A S S U N G	64
6. A N H A N G : T A B E L L E N	66
7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	72
L E B E N S L A U F	90

1. E I N L E I T U N G

Der rote Blutfarbstoff wurde erstmals 1862 (1) von Felix Hoppe Seyler (1825 - 1895) in Tübingen kristallisiert (70). Er war es auch, der den Namen "Hämoglobin" dafür prägte (16).

Schon vier Jahre später, 1866, stellte Körber (60) fest, daß es sich nicht um einen einheitlichen Stoff handelt: Bei der Beobachtung, daß das Hämoglobin verschiedener Tiere bei Behandlung mit Säuren bzw. Laugen unterschiedlich stark denaturierte, stieß er auch auf das menschliche fetale Hämoglobin; es war relativ alkaliresistent. Erst fast hundert Jahre später folgten eingehende Analysen mit endgültiger Klärung der Primärstruktur des Globins durch Braunitzer et al. (15,17,18) und Königsberg und Hill (40, 63). Fast gleichzeitig wurde auch die räumliche Struktur des Hämoglobinmoleküls durch Perutz et al. (92) mit Hilfe von Analysen durch Röntgenstrahlbeugung aufgeklärt.

Das Hämoglobin ist demzufolge ein Chromoprotein. Der Eiweißanteil, das Globin, stellt ein Tetramer aus vier Aminosäuren-Ketten dar, deren unterschiedliche Zusammensetzung die Differenzierung der verschiedenen Hämoglobine ermöglicht: So besteht beispielsweise das HbA, die Hauptfraktion der adulten Hämoglobine, aus zwei α - und zwei β -Ketten, während HbA₂, die Minor-Komponente der adulten Blutfarbstoffe, zwei α - und zwei δ -Ketten aufweist und das fetale Hämoglobin, HbF, sich aus zwei α -Ketten plus zwei γ -Ketten zusammensetzt. Die Aminosäure-Ketten sind wiederum jeweils mit einer Häm-Gruppe (Eisen-Protoporphyrin-Komplex) verbunden. Diese molekulare Struktur befähigt das Hämoglobin zu seinen wichtigen Funktionen:

1. Der reversiblen O₂-Bindung an das Eisen
2. Dem CO₂-Transport
3. Der Pufferung mittels -COOH und -NH, Resten der Aminosäuren

Diese Aufgaben werden von den verschiedenen anomalen Hämoglobinen, die sich in ihrer Primärstruktur (d.h. also der Amino-

säuren-Sequenz) ihrer Globin-Ketten unterscheiden und in einer Vielzahl neben den oben erwähnten physiologischen existieren (Übersichten s. 8,47,68,104), verschieden gut bewältigt. Aus dieser Tatsache ergibt sich u.a. auch die klinische Relevanz der Forschung an einzelnen Hämoglobin-Fraktionen bzw. -Varianten.

Das erste anomale Hämoglobin entdeckten 1948 Hörlein und Weber, die eine chronische familiäre Met-Hämoglobinämie beschrieben und dabei auf das andersartige Hämoglobin aufmerksam wurden (42). Die Bedeutung dieser Entdeckung wurde aber eigentlich erst 1949 gewürdigt, als Pauling et al. das genetisch determinierte Sichelzellanämie als molekulare Ursache der Sichelzellanämie erkannten (89). Das HbS führt bei Homozygotie zu schweren Schmerzkrisen und Hämolyse, beeinträchtigt aber bei Heterozygotie das Leben kaum. Sein Selektionsvorteil besteht in einer besseren Malaria-Resistenz des heterozygoten Trägers, was das gehäufte Vorkommen in Malaria-Gebieten erklärt.

Von diesem Zeitpunkt an wurde das Hämoglobin unter allen möglichen Fragestellungen, sowohl struktureller wie auch funktioneller Art, untersucht. Neue Methoden machten dabei genaue Analysen möglich, so z.B. die röntgenkristallographischen Studien von Perutz, der damit die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur aufklären konnte (92). Auch die Beziehung zwischen Struktur und Funktion wurde Gegenstand der Forschung (76,90,91). Zudem wurden nicht nur pathologische bzw. seltene Hämoglobin-Varianten entdeckt, sondern man konnte auch die Tatsache weiter unterbauen, daß schon physiologischerweise verschiedenartige Hämoglobine existieren, die im Laufe des Lebens verschieden stark hervortreten.

Das HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), eine normalerweise ca. 2,5% ausmachende Fraktion im Blutfarbstoff der Erwachsenen, wurde erstmals von Kunkel und Wallenius mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese nachgewiesen (64). Die weitere Erforschung des HbA₂ erfolgte u.a. durch Ingram und Stretton 1961, Muller und Jonxis 1960 und Muller 1961 (51,77,78). Durch Aufklärung der Primärstruktur

konnte gezeigt werden, daß die δ -Ketten des HbA₂, den β -Ketten des HbA sehr ähnlich sind (41,52).

Für die Routineanalyse der Hämoglobine mit Nachweis von HbA₂, bot sich außer der oben genannten Stärkegel-Elektrophorese als weitere zuverlässige und ergiebige Methode die Säulenchromatographie an (48,49).

1.1 EIGENE FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll ein Aspekt behandelt werden, der trotz der intensiven Forschung an Hämoglobinen bisher kaum bearbeitet worden ist.

Die Umschaltung von einem Hämoglobin auf das nächstfolgende in der Ontogenese wurde bisher nur ausführlich für das Ablösen des fetalen Hämoglobins, HbF, durch die Hauptfraktion der adulten Blutfarbstoffe, das HbA, untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß HbA bereits in ersten Spuren nach der 12. Gestationswoche nachzuweisen ist (106). Es soll dann bis zur 20. Entwicklungswoche auf 10% ansteigen und bis zur 33./34. Schwangerschaftswoche (SSW) auf dieser Höhe bleiben. Durch den darauffolgenden raschen Anstieg werden nach den Untersuchungen von Walker und Turnbull (106) Werte von 20-40% HbA zum Zeitpunkt einer termin-gerechten Geburt erreicht. Das HbF verschwindet reziprok zum Anstieg des HbA.

Während für diese beiden Hämoglobin-Fraktionen also bereits relativ genaue Vorstellungen über ihre Anteile am Gesamtblutfarbstoff in den letzten intrauterinen Wochen eines Feten und somit über ihr Ansteigen bzw. Verschwinden bestehen, ist dies für das HbA₂ noch sehr unklar: Es stellt sich zum einen die Frage, wie hoch die jeweiligen Anteile des HbA₂ zu bestimmten Zeitpunkten der fetalen Entwicklung sind, und zum anderen ist zu klären, ob das HbA₂ eine äquivalente Entwicklung wie das HbA durchmacht: D.h. ob es ebenfalls in der 20. SSW wie das HbA 10% seines adulten Wertes (2,5%), also ca. 0,25% erreicht, bzw. bei der termin-gerechten Geburt 20-40% davon (das wären ca. 0,5% - 1,0% HbA₂). In diesem Fall würden HbA und HbA₂ also zum gleichen Zeitpunkt

erstmals gebildet und im folgenden synchron ansteigen.
Ob dies der Fall ist oder nicht, soll mit dieser Arbeit aufgeklärt werden, da es u.a. Bedeutung für die Regulation der Gen-Expression hat, einer bisher noch ungeklärten, aber sehr wichtigen Frage für Klinik und Forschung.

2. P R O B A N D E N, M A T E R I A L, M E T H O D E

2.1 UNTERSUCHTE KINDER BZW. PROBANDEN

Untersucht wurde das Nabelschnurblut von 73 Neu- bzw. Frühgeborenen, die sich auf der Neugeborenen-, Wöchnerinnen- oder Intensivstation der I. Universitätsfrauenklinik bzw. dem Klinikum Großhadern befanden (*). Der Untersuchungszeitraum betrug ca. ein Jahr (Mai 1983 bis August 1984).

Die Altersspanne umfaßt die 28. bis einschließlich 41. SSW. Drei Fälle der 26. SSW wurden aufgrund stark abweichender Ergebnisse getrennt behandelt.

Als Referenzgruppe wurden 10 Erwachsene unterschiedlichen Geschlechts und Alters, sowie ein 13-Jähriger herangezogen.

2.2 BLUTPROBEN

Bei allen Blutproben der Neugeborenen handelte es sich um Nabelschnurblut, das nach Abtrennung des Kindes aus der Plazenta nachfloß. Es wurde in EDTA- oder heparinisierten Röhrchen im Kühlschrank aufbewahrt, wie auch das venös abgenommene und mit Heparin versetzte Blut der Erwachsenen.

Größtenteils folgte die Verarbeitung des Blutes so schnell wie möglich, war aber auch, wie Kontrollen zeigten, noch bis zu sieben Tage später möglich. Einige Proben wurden als Hämolysat eingefroren und waren dann sogar noch nach einigen Monaten verwertbar.

* Für die freundliche Überlassung der Blutproben danke ich Herrn Prof. Dr. med. J. Zander, Direktor der I. Universitätsfrauenklinik und Herrn Prof. Dr. med. H. Hepp, Direktor der Frauenklinik im Klinikum Großhadern.

2.3 HÄMOLYSATHERSTELLUNG

Ca. 2 ml Blut wurden mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, anschließend bei 4000 U' 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen. Der Vorgang wurde drei Mal wiederholt, dann das Erythrozyten-Sediment in einem Volumenverhältnis von 1:1:1 mit Aqua dest. und Tetrachlorkohlenstoff versetzt und 5 Minuten geschüttelt. Nach abschließendem Zentrifugieren (15 Minuten bei 4000 U') befand sich das stromafreie Hämolysat im Überstand und konnte abpipettiert werden.

2.4 Hb-MESSUNG

Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes erfolgte über die Umwandlung des Gesamthämoglobins in Cyanmethämoglobin und spektrophotometrische Messung.

Das hergestellte Hämolysat wurde dazu mit Tris-Puffer 1:100 verdünnt, 0,5 ml dieser Verdünnung mit 2 ml Transformationslösung, die Kaliumferricyanid und Kaliumcyanid enthielt (12), versetzt und anschließend bei 540 nm photometriert.

Die Berechnung erfolgte laut untenstehender Formel in Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes mit Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (95):

$$\text{Hb} = \frac{E(P) \times 64\,458}{44\,000} \times \frac{5,02}{0,02} \text{ g/100 ml}$$

Dabei bedeuten: E(P) = Extinktion der Probe

64 458 = Molekulargewicht des Hämoglobins (Hb)

44 000 = Extinktionskoeffizient des HbA bei
549 nm

5,02/0,02 = Verdünnung der Meßprobe

Die Konzentrationen der unverdünnten Hämolysate lagen zwischen 6,6 und 15,3 g/100 ml. Die starke Verdünnung wurde durchgeführt, um im gleichen Meßbereich des Photometers (Eppendorf) zu liegen wie die Eluate aus der Säulenchromatographie, die auf gleiche Weise photometriert wurden, und damit bessere Vergleichsmöglichkeiten zu haben.

2.5 HbF-MESSUNG

Das HbF wurde im Hämolysat mit Hilfe der Alkali-Denaturierung nach Betke et al. (10) bestimmt. Entgegen der üblichen Routine wurde hierbei jedoch der Verlust von ca. 15% berücksichtigt, der auf der Tatsache beruht, daß HbF ebenfalls, wenn auch wesentlich langsamer, durch die Natronlauge denaturiert wird. Das Ausmaß dieses Verlustes wurde in eigenen Untersuchungen bestätigt. Stoppt man die Denaturierung statt nach den üblichen 2 Minuten nach z.B. 5, 10 und 15 Minuten, so stellt man einen exponentiellen Abfall des HbF-Anteiles fest, mit Hilfe dessen man den Verlust und damit den wirklichen HbF-Wert berechnen kann (Abb.2).

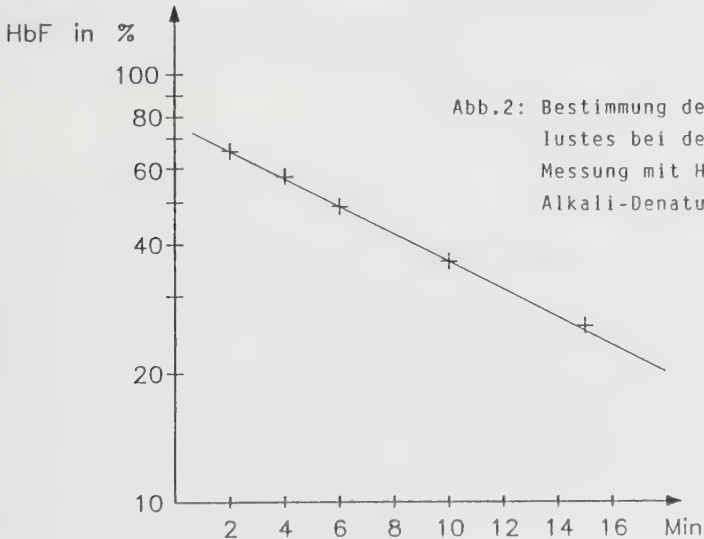


Abb.2: Bestimmung des Verlustes bei der HbF-Messung mit Hilfe der Alkali-Denaturierung

2.6 METHODE DER CHROMATOGRAPHISCHEN AUFTRENNUNG DER HÄMOLYSATE

Die Auftrennung der Hämolysate in HbA₂ und HbA + HbF erfolgte mit Hilfe einer säulenchromatographischen Methode nach Efremov et al. (29), die in einigen Punkten modifiziert wurde.

2.6.1 Herstellung der Puffer

Als Stammlösung diente eine 0,05 molare Tris-Lösung (12,1 g Tris auf 2 l aqua dest.), die auf 1000 ml 100 mg KCN enthielt und mit HCl auf die benötigten pH-Werte von 8,85 / 8,25 / 7,00 titriert wurde.

Der pH-Wert mußte jeweils vor Gebrauch mit dem pH-Meter überprüft werden, da trotz Aufbewahrung im Kühlschrank Schwankungen auftraten. Abweichungen zum sauren Bereich hin sollten mit dem Puffer pH 8,85 bzw. der noch nicht zurücktitrierten Stammlösung ausgeglichen werden, da sich bei Anwendung von NaOH der pH als besonders instabil erwies.

2.6.2 Cellulose-Präparation

Verwendet wurde der Anionen-Austauscher "DE 52 preswollen, microgranular", hergestellt von der Firma Whatman in England. Die Cellulose wurde mit dem Puffer pH 8,85 aufgeschwemmt, mit HCl auf pH 8,85 titriert und mit dem gleichen Puffer über eine Glasfritte (Porengröße 3-4) gewaschen, bis sie, bzw. das Eluat, sowohl vom pH her, wie auch von der Leitfähigkeit her äquilibriert war. Eine Überprüfung der Leitfähigkeit erwies sich als überflüssig, wenn die Kontrolle des pH eine Äquilibration ergab. Für 80 g Cellulose waren ca. 1 l Puffer notwendig. Die Benutzung der Glasfritte, die evtl. noch über eine vakuumfeste Saugflasche an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen werden kann, hat den Vorteil einer großen

Zeitersparnis gegenüber der üblichen Methode des Absetzenlassens (29).

Die Cellulose kann im Kühlschrank aufbewahrt werden, sollte dann aber ebenfalls im pH kontrolliert werden.

2.6.3 Beschickung der Säulen

Die Glassäulen hatten eine Länge von 20 cm und einen Durchmesser von 1,5 cm. An ihrer ausgezogenen Spitze wurden sie mit kleinen Schlauchstücken versehen, um sie gegebenenfalls mit Klemmen verschließen zu können. Als Abdichtung nach unten diente ein kleiner Watte-Pfropf, mit Puffer pH 8,85 angefeuchtet. Die vorbereitete Cellulose wurde auf eine definitive Säulenhöhe von ca. 10 cm eingefüllt, wobei der überschüssige Puffer aus der Celluloseaufschwemmung nach unten abfließen konnte und verworfen wurde. Falls beim Füllen Gasblasen in der Cellulose auftraten, wurden Puffer und Cellulose vorher über eine an die Wasserstrahlpumpe angeschlossene Vakuumflasche entgast. Meistens erübrigte sich dies, da das Volumen der Glassäulen relativ klein war. Bevor die Oberfläche austrocknen konnte, wurde noch einmal mit ca. 50 ml Puffer pH 8,85 äquilibriert, bis auch im Eluat der gleiche pH zu messen war.

2.6.4 Chromatographie

Als Proben wurden jeweils 400 µl des unverdünnten Hämolyrates mit 400 µl Puffer (pH 8,85) und 2,4 ml aqua dest. vermischt. Sie wurden mit Pasteur-Pipetten vorsichtig und möglichst gleichmäßig auf die Säulenoberfläche, auf der sich ca. noch 0,5 cm Puffer als Überstand befand, aufgetragen. Sobald das Hämolyrat einge-zogen war, begann die Trennung mit dem Puffer pH 8,25. Dieser größere pH-Sprung (8,85 auf 8,25) im Vergleich zu der von Efre-

mov beschriebenen Methode (29) (8,5 auf 8,3) ergab eine schärfere Trennung und erleichterte damit das Erkennen minimalster Banden HbA₂ bei Frühgeborenen (*).

Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 0,8 - 0,9 ml / Minute. HbA₂ erschien als scharfe Bande nach ca. 30 ml und wurde in ca. 25 ml aufgefangen.

Anschließend wurden mit dem Puffer pH 7,00 HbA + HbF gemeinsam heruntergewaschen und in 50 ml aufgefangen.

Eine bleibende leichte Verfärbung der Säulen könnte auf denaturiertes Hämoglobin zurückzuführen sein und ließ sich auch durch langes Waschen nicht beseitigen (s. hierzu S. 13).

2.6.5 Berechnung von HbA₂ und HbA / HbF

Die HbA₂-Fraktion wurde mit Ultrafiltern ("millipore 25, immer-sible CX 10 TM" von der Firma TM Millipore Corporation, Bedford Massachusetts) auf 1 ml eingeengt, die HbA / HbF-Fraktion belassen und beide mit o.g. Methode photometriert. Die Hb-Konzentration und die prozentualen Anteile von HbA₂ sowie HbA + HbF im Hämolysat konnten aus der gemessenen Extinktion und der eingesetzten Menge berechnet werden.

2.7 NACHWEIS VON HbA₂ / HbA UND HbF IN DEN ELUATEN

Zum Beweis, daß die heruntergewaschenen Fraktionen auch wirklich die postulierten waren, wurde eine Elektrophorese an die

* Für die freundliche Beratung in methodischen Fragen danke ich Herrn Prof. Dr. Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, München.

Säulenchromatographie angeschlossen. Damit war zugleich eine grobe qualitative Abschätzung über die Reinheit der getrennten Fraktionen möglich.

Wie die Chromatographie beruht auch die elektrophoretische Trennung der Hämoglobine auf unterschiedlicher, typischer Laufgeschwindigkeit (hier im elektrischen Feld) der einzelnen Hämoglobin-Fraktionen, anhand derer sie identifiziert werden können.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis:

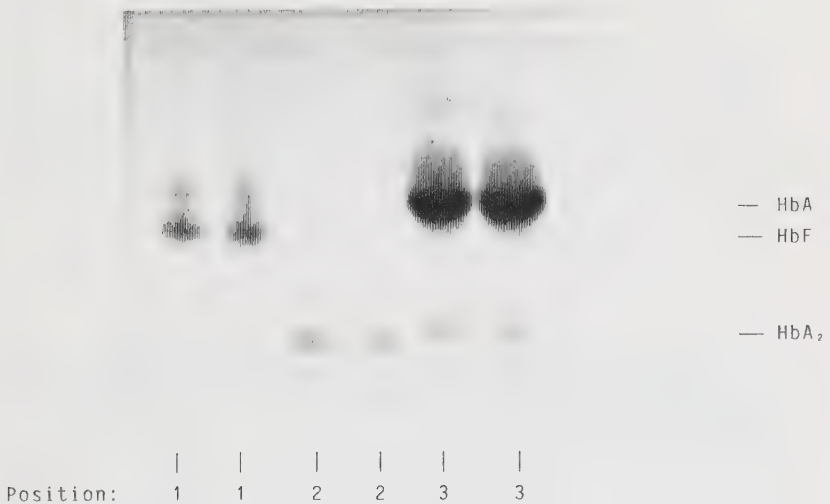


Abb. 2: Elektrophorese der getrennten Fraktionen sowie eines Thalassämie-Blutes

Als Referenz wurde Hämolysat eines Patienten mit heterozygoter β -Thalassämie (Position 3), bei dem der HbA₂-Gehalt erhöht und damit als Bande besser zu erkennen ist, aufgetragen. Auf Position 2 befand sich das eingeeingte, und damit konzentrierte Eluat

der ersten Bande der Säulenchromatographie. Es wanderte, wie zu erkennen ist, auf der Höhe des HbA₂ des Referenzblutes und konnte somit ebenfalls als HbA₂ identifiziert werden. Da die Bande makroskopisch relativ scharf ist, obwohl sie zur Konzentrierung mehrmals aufgetragen werden mußte, läßt sich zumindest eine grobe Verunreinigung durch andere Fraktionen ausschließen.

Auf gleiche Weise konnte auch die zweite Fraktion der Säulenchromatographie (Position 1) identifiziert werden. Dabei ist zu beachten, daß es sich um Neugeborenenblut handelte, das zur Hauptsache HbF und nur einen geringeren Teil HbA enthielt. Dies ist auch chromatographisch erkennbar, da HbF etwas langsamer als HbA läuft und demzufolge knapp hinter ihm zu liegen kommt, wie das im gegebenen Beispiel auch der Fall ist. HbA ist, wie zu erwarten, nur als schwächere Bande und damit in geringerer Konzentration im zweiten Eluat nachweisbar.

2.8 METHODENKRITISCHE DISKUSSION

Die Genauigkeit der Messungen kann einmal durch Faktoren der Methode selbst, zum anderen durch instrumentelle Ungenauigkeiten negativ beeinflußt werden.

Folgende Fehlerquellen sind daher zu berücksichtigen:

a) Denkbar ist eine fehlerhafte Bestimmung durch unsaubere Trennung der Banden, d.h. Verunreinigung der Fraktionen durch andere Hämoglobine, die sich photometrisch ja nicht nachweisen lassen, da das Absorptionsmaximum für alle Hämoglobine gleich ist. Durch möglichst scharfe Trennung (u.a. durch optimale pH-Einstellung der Puffer erreichbar) wurde versucht, diesem entgegenzuwirken. Eine gewisse Kontrolle bot dabei die Elektrophorese. Ferner wurde zur Überprüfung in einigen Fällen das zwischen den Fraktionen abgelaufene Eluat photometrisch vermessen. Es zeigte keine Absorption bei 540 nm, was für eine gute Trennung sprach.

b) Um die Genauigkeit der photometrischen Messung zu überprüfen, wurden Standard-Hämoglobin-Lösungen mit definiertem Hb-Gehalt (von Sigma chemical company) gemessen und berechnet. Dabei wichen die gemessenen Werte von den eingesetzten Mengen im Durchschnitt um $1,5 \pm 1,1\%$ ab. Diese Ungenauigkeit konnte selbst bei den schwachen Konzentrationen, die vermessen werden mußten, vernachlässigt werden (s. hierzu Tab. I im Anhang).

c) Die zurückbleibende Verunreinigung der Säulen wurde bereits angesprochen. Es war anzunehmen, daß sie auf festgehaltenem, ggf. denaturiertem Hämoglobin beruhte.

Theoretisch müßte die Menge an Hämoglobin im aufgebrauchten Hämolystat identisch sein mit der Summe der Mengen, die in den Fraktionen gemessen wurden, d.h. eingesetzte Menge müßte gleich ausgewaschener sein. Es ergab sich bei einer Gesamtzahl von 92 Messungen, daß die heruntergewaschene Hämoglobinmenge im Durchschnitt $96,7 (\pm 12,5) \%$ der Hb-Menge ausmachte, die eingesetzt worden war. Die Frage, ob diese Ungenauigkeit alle drei Hb-Fraktionen in gleicher Weise betraf, mußte offen bleiben.

d) In 21 wahllos bestimmten Fällen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, um ein Maß für die Reliabilität der Säulenchromatographie zu haben. Bei Meßwerten, die zwischen $0,07\%$ und $0,49\%$ HbA₂ lagen, betrug die mittlere Abweichung zwischen den Doppelwerten $0,05\%$. Eine genauere Aufschlüsselung zeigt folgende Tabelle:

Tab. 1: Abweichungen der Doppelbestimmungen

Anzahl der Doppelbestimmungen	Meßbereich d. HbA ₂ -Anteils am Gesamtblutfarbstoff	Differenz der Doppelwerte vom Mittelwert in % des Mittelwertes
8	0,07 - 0,16 % HbA ₂	11,2 %
6	0,17 - 0,30 % HbA ₂	8,7 %
6	0,31 - 0,41 % HbA ₂	9,8 %

Insgesamt betrugen die Differenzen 9,9% vom Mittelwert beider Meßwerte. Diese relativ großen Differenzen ergaben sich aus dem niedrigen Meßbereich, in dem die Meßwerte lagen, wo sich schon kleinste Abweichungen z.B. beim Ablesen des Photometers, besonders stark bemerkbar machten.

2.9 WAHL DER METHODE

Heutzutage wird als Screeningverfahren der Hämoglobinanalyse der elektrophoretischen Auftrennung der Hämoglobine und der anschließenden densitometrischen Messung zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Fraktionen der Vorzug gegeben, da sie wesentlich weniger aufwendig ist.

Ihr Nachteil besteht allerdings zum einen in der größeren Ungenauigkeit: Verschmutzungen können die Densitometrie verfälschen; die Abgrenzung der Banden ist schwieriger und, da willkürlich festlegbar, auch ungenauer.

Zum anderen, und dies ist der hauptsächliche Grund, warum die Säulenchromatographie für die vorliegende Fragestellung zur Anwendung kam, ist die Elektrophorese für so geringe Mengen HbA₂ nicht empfindlich genug. Versuche zeigten, daß sie im Nabelschnurblut kein HbA₂ nachweisen bzw. messen konnte.

Diese geringen Konzentrationen zwangen auch zu den größeren Säulen (Efremov verwandte die viel kleineren Pasteur-Pipetten (29)), um sie mengenmäßig mit mehr Hämolysat beladen zu können, und damit die HbA₂-Bande auch makroskopisch eindeutig sichtbar zu machen.

Für die photometrische Messung war aus dem gleichen Grund die Einengung notwendig.

3. E R G E B N I S S E

3.1 ERWACHSENEN VERGLEICHSPOPULATION

Bei den 10 erwachsenen Probanden und dem 13-Jährigen fanden sich HbA₂-Werte zwischen 1,4% und 2,7%, wobei die meisten Werte etwas unterhalb von 2,0% lagen (s. Tabelle III im Anhang), also etwas tiefer als die von Kohne (61) für eine Chromatographie angegebenen Werte: Der Mittelwert lag bei 1,8% HbA₂, HbF bewegte sich zwischen 0,0% und 0,43% und war somit auch nur in geringen Mengen nachweisbar.

In der zum Vergleich herangezogenen Literatur fanden sich u.a. folgende Angaben über die physiologischen Hämoglobin-Anteile:

— Lehmann und Huntsman (68) gaben für Erwachsene an:

HbA : ca. 98%

HbA₂ : ca. 2%

HbF : fast vollständig verschwunden

— Betke (8) beziffert die HbA₂-Fraktion im Mittel auf 2,0 - 2,5%, während er für HbF beim Erwachsenen 0,3 - 0,9% angibt.

Auch die Meßmethode beeinflußt die Höhe der Werte, wie

— Kohne (61) in einem Vergleich zeigt:

HbA₂ bei Stärkeblockelektrophorese: 1,6 - 3,2%

HbA₂ bei DEAE-Sephadex-Chromatographie:

2,08 - 3,17%

Die Ergebnisse zeigten, daß die von mir benutzte Modifikation der Säulenchromatographie zum Nachweis von HbA₂ durchaus mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse lieferte, d.h. also nicht grundsätzlich nach oben bzw. unten abwich, was eine Korrektur beim Vergleich der gemessenen Neugeborenen-Werte mit den entsprechenden Angaben der Literatur notwendig gemacht hätte.

3.2 ENTWICKLUNG DER EINZELNEN Hb-FRAKTIONEN MIT ZUNEHMENDER REIFE DES KINDES

Für die "Reife" des Neugeborenen standen drei verschiedene Parameter zur Auswahl:

- Schwangerschaftswoche (SSW)
- Geburtsgewicht
- Reifezeichen nach Petrussa

Alle drei weisen mehr oder weniger starke Korrelationen zur Entwicklung des Kindes auf, wobei die Angabe zu Petrussa sicherlich die Reife am genauesten widerspiegelt.

Die Hb-Fraktionen bzw. ihre Meßwerte wurden nun diesen Parametern zugeordnet mit der Fragestellung, ob und welche Korrelationen zwischen ihnen und der Reife des Kindes bestehen.

3.2.1 HbA-Entwicklung

In Abb. 3 werden die HbA-Werte der SSW gegenübergestellt:

Dabei wurden drei Gruppen gebildet:

Die erste umfaßt die 28. - 31. SSW,

die zweite beinhaltet die 32. - 36. SSW

und die dritte die 37.- 41. SSW.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der einzelnen Gruppen, sowie die Standardabweichungen $\bar{s}$ innerhalb dieser.

Wie nicht anders zu erwarten, steigt HbA mit zunehmender SSW an. Dies ließ sich auch im T-Test bestätigen: Der Anstieg ist auf dem 5%-Niveau signifikant.

Das gleiche Resultat ergab sich entsprechend für die Zuordnung HbA zum Gewicht: Auch hier wurde das 5%-Niveau erreicht.

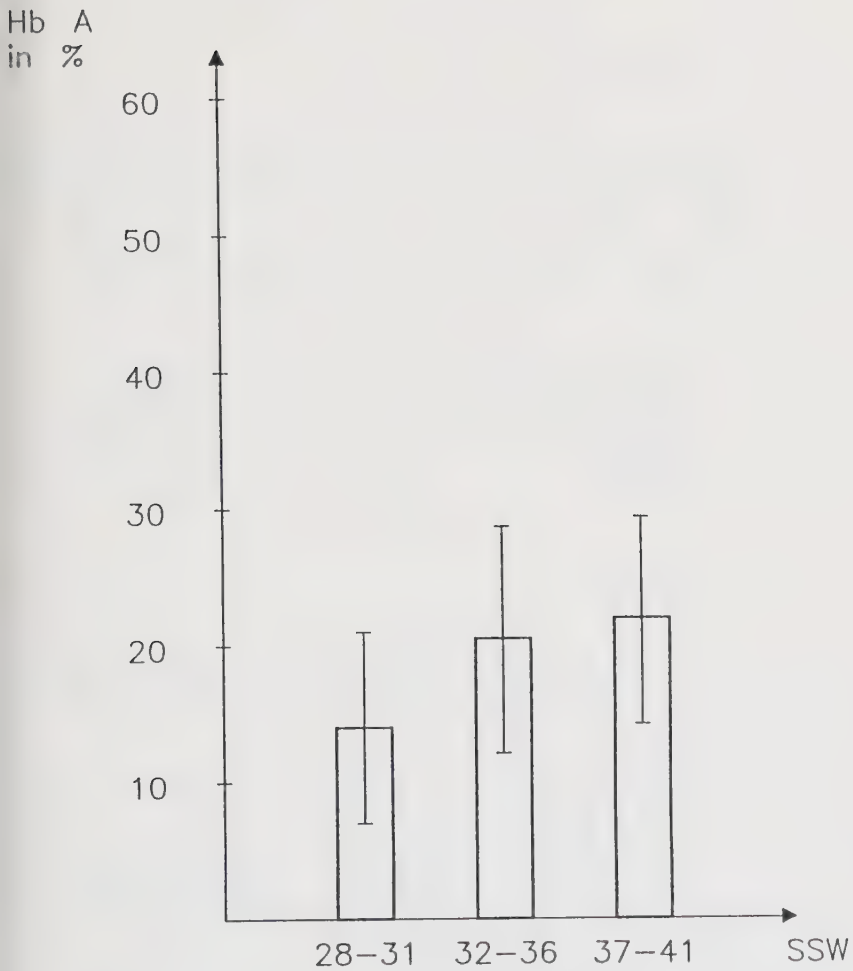


Abb. 3: HbA in % des gesamten Blutfarbstoffes mit zunehmender SSW
(Mittelwerte und Standardabweichungen)

3.2.2 HbF-Entwicklung

Entsprechend HbA wurde mit den Meßwerten von HbF verfahren. Abb. 4 zeigt das Ergebnis der Gegenüberstellung HbF / SSW. Diese Korrelation, die den Abfall des HbF mit zunehmendem Alter des Kindes verdeutlicht, war im T-Test sogar auf dem 0,05%-Niveau signifikant, während sich für den Rückgang des HbF mit zunehmendem Gewicht des Kindes ein Signifikanzniveau im T-Test von 5% ergab.

Insgesamt reichten die gemessenen HbF-Anteile von 60,5% bis 92,7%. Diese große Bandbreite spiegelt nicht nur den Abfall des HbF mit zunehmender Reife des Kindes wieder, sondern beruht auch auf starken individuellen Schwankungen innerhalb einer Alters- bzw. Reifegruppe.

3.2.3 HbA₂-Entwicklung

Die Entwicklung bzw. Zunahme des HbA₂, der für diese Arbeit wichtigsten Fraktion, wurde versucht anhand der SSW, dem Geburtsgewicht und der Reife nach Petrussa festzuhalten und zu quantifizieren.

Die gemessenen HbA₂-Werte lagen in einem Bereich zwischen 0,0% und 0,41% des gesamten Hämoglobins.

Im T-Test ergab sich eine signifikante positive Korrelation für das Gewicht und die SSW auf dem 1%-Niveau, für Petrussa lag es bei 5% (was mathematisch aber durchaus ein Effekt der geringeren Fallzahl gegenüber z.B. der SSW sein kann).

Die Abb. 5 veranschaulicht das Ergebnis, Entwicklung des HbA₂ bei zunehmender SSW, graphisch. Auch hier wurde wieder die Zusammenfassung zu Gruppen wie in den vorausgegangenen Abbildungen vorgenommen.

Der durchschnittliche Wert für "reife" Neugeborene (ab 38. SSW) lag bei 0,19%.

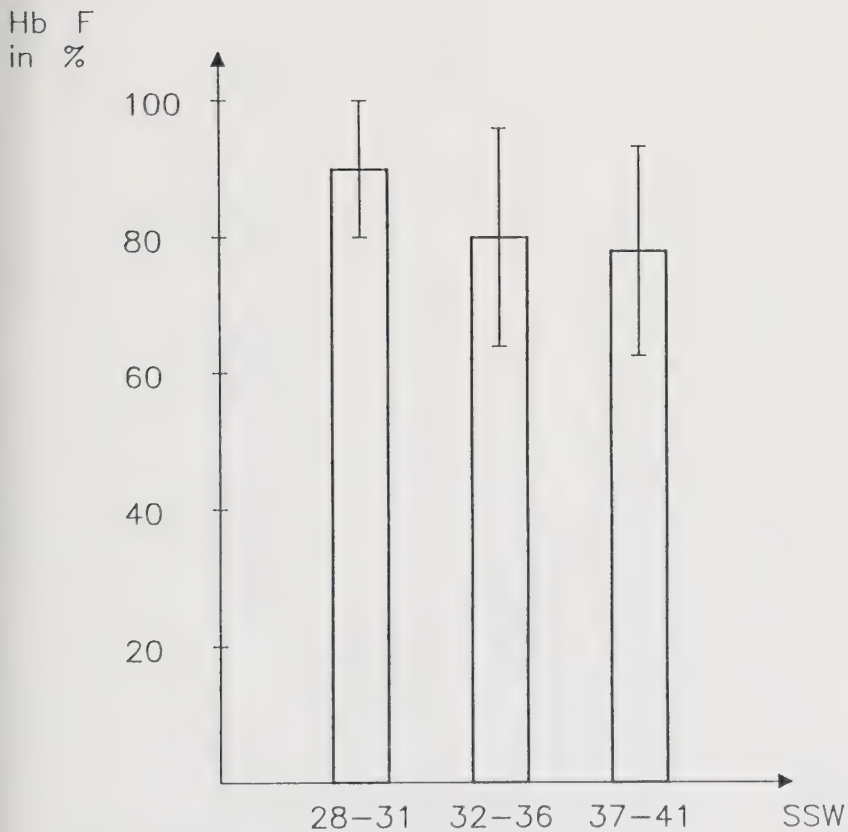


Abb.4: Anteil des HbF in % des gesamten Blutfarbstoffes mit zunehmender SSW
(Mittelwerte und Standardabweichungen)

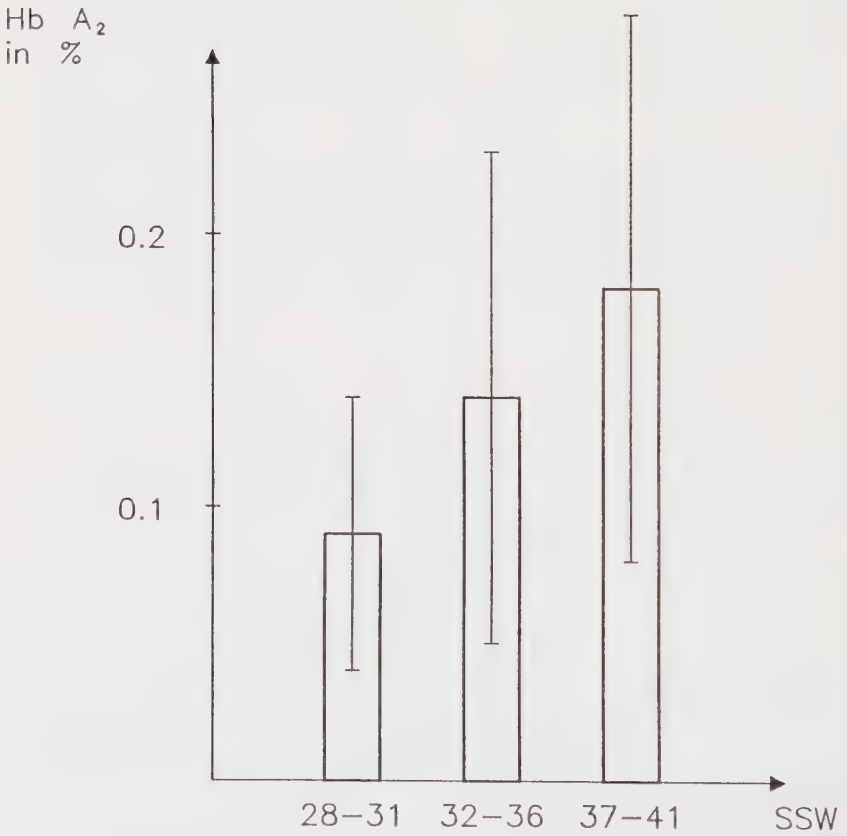


Abb.5: Anteil des HbA₂ in % des gesamten Blutfarbstoffes mit zunehmender SSW
(Mittelwerte und Standardabweichungen)

Auch die Höhe der HbA_2 -Anteile, wenn die Gruppen statt nach der SSW nach Petrusa bzw. Gewicht (Abb. 6 und 7) gebildet werden, ändert sich für jede "Reifeklasse" der Neugeborenen nur unwesentlich:

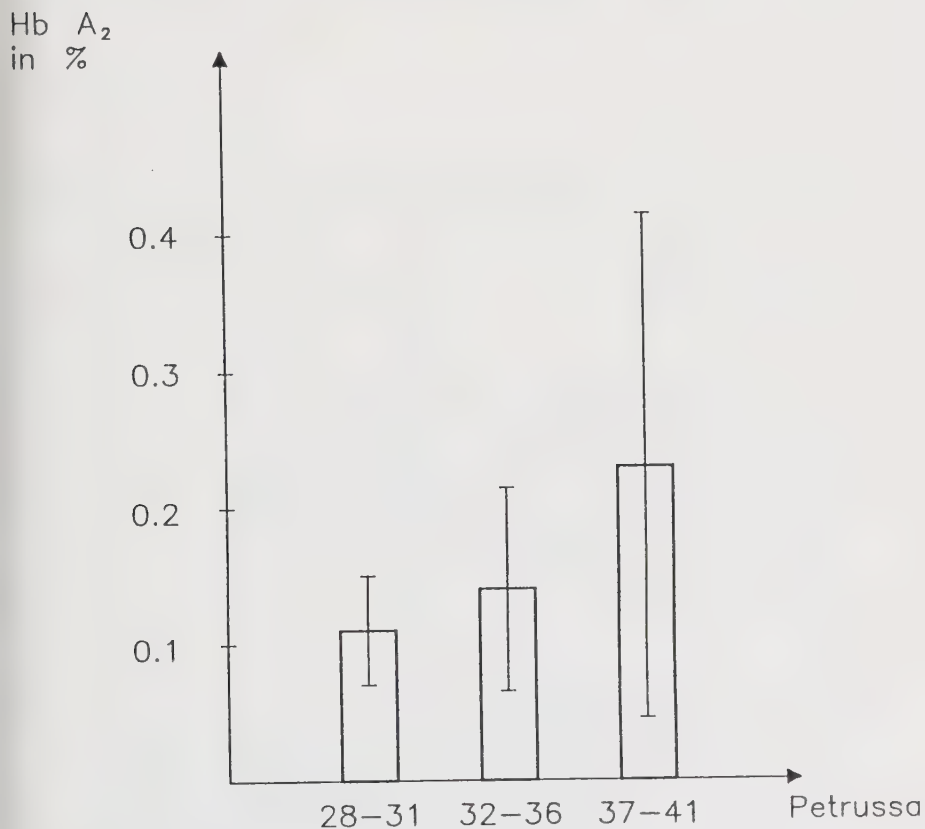


Abb. 6: Anteil des HbA_2 , in % des gesamten Blutfarbstoffes mit zunehmender Reife nach Petrusa (Mittelwerte und Standardabweichungen)

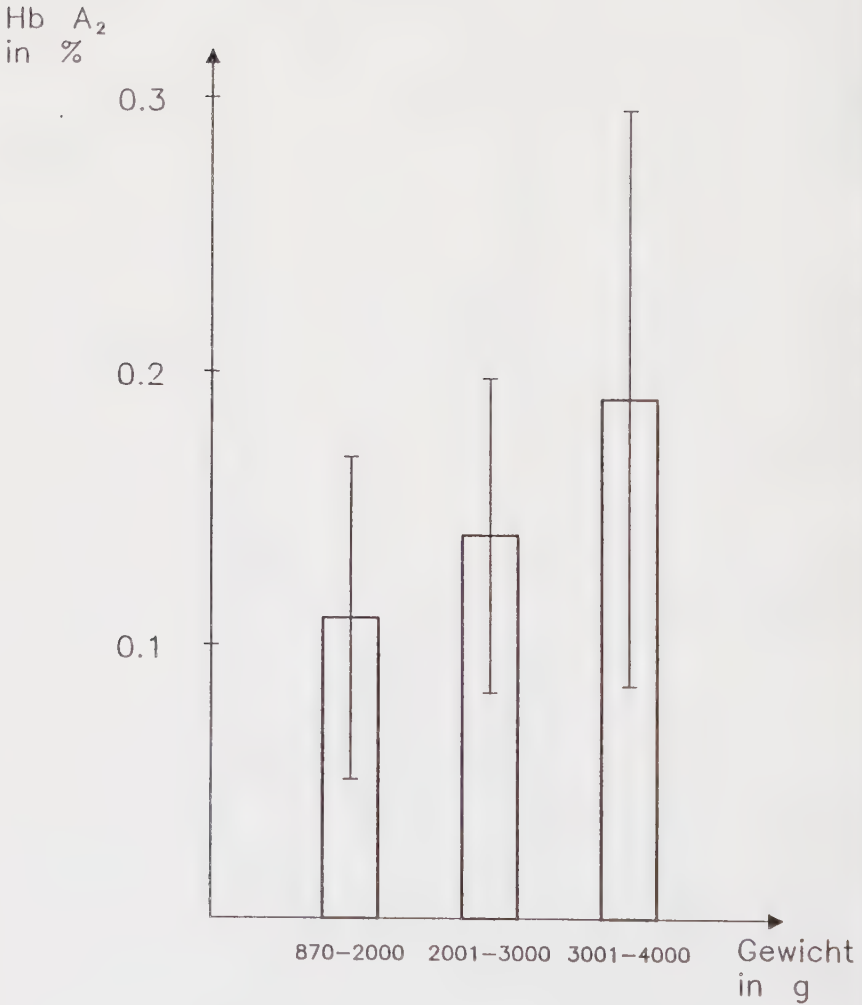


Abb.7: Anteil des HbA₂ in % des gesamten Blutfarbstoffes mit zunehmendem Gewicht des Neugeborenen (Mittelwerte und Standardabweichungen)

3.3 VERHÄLTNIS VON HbA_2 ZU DEN ANDEREN FRAKTIONEN

Im folgenden Abschnitt soll die Korrelation zwischen dem HbA_2 -Anteil und dem der beiden anderen Fraktionen, HbA und HbF , untersucht werden.

3.3.1 HbA_2 zu HbA

Wie nicht anders zu erwarten, besteht zwischen der Höhe beider Hb -Anteile eine starke positive Abhängigkeit, d.h. je höher HbA bei einem Neugeborenen ist, desto höher dürfte auch sein HbA_2 -Gehalt sein.

Im T-Test wurde ein Signifikanzniveau von 1% erreicht. Der Korrelationskoeffizient bestätigte die starke gegenseitige Abhängigkeit.

In Abb. 8 wurden auf der Abszisse der prozentuale HbA -Anteil aufgetragen und entsprechend dazu auf der Ordinate der zugehörige HbA_2 -Wert desselben Kindes. Die eingezeichnete Gerade stellt die zugehörige errechnete Regressionsgerade dar, womit jedoch nicht ausgesagt werden soll, daß der Anstieg von HbA_2 in Relation zum Anstieg von HbA tatsächlich geradlinig ist (s. hierzu S.30).

3.3.2 HbA_2 zu HbF

In diesem Fall war die umgekehrte Beziehung zu erwarten gewesen: Je niedriger HbF ist, desto höher sollte der HbA_2 -Gehalt sein, entsprechend der zunehmenden Reife des Kindes. Auch hier konnte der angenommene Zusammenhang im T-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 1\%$ bestätigt werden.

In Abb. 9 wurden analog zur vorhergehenden Abbildung die einzelnen HbA_2 -Werte in Abhängigkeit vom gemessenen HbF -Wert, sowie die berechnete Regressionsgerade eingetragen.

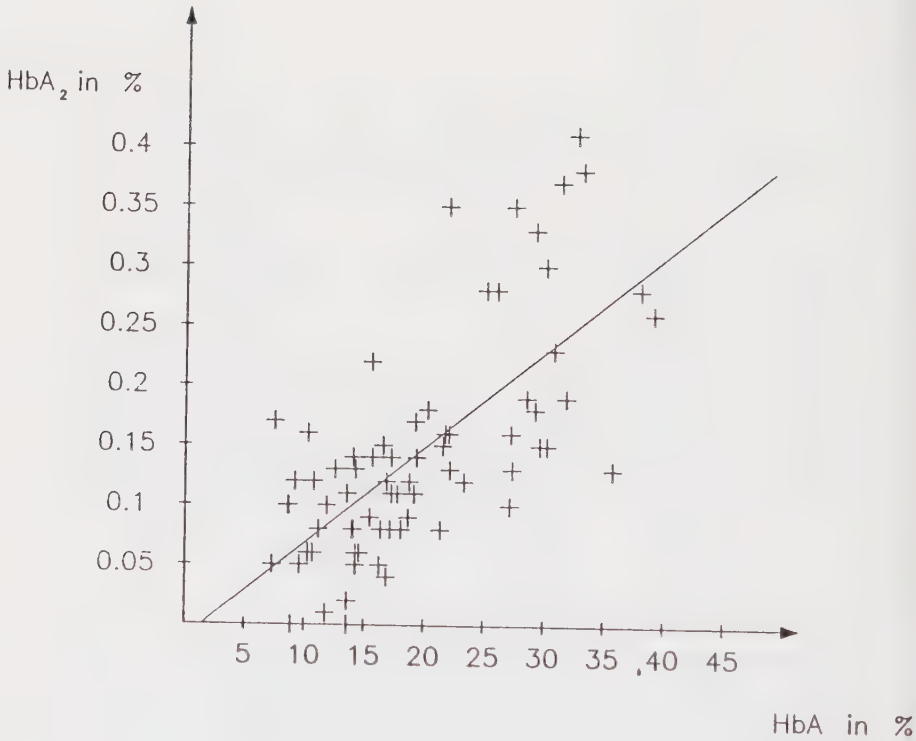


Abb 8: Prozentualer Anteil von HbA₂ am Gesamtblutfarbstoff in Relation zum prozentualen Anteil von HbA (Einzelwerte und Regressionsgerade)

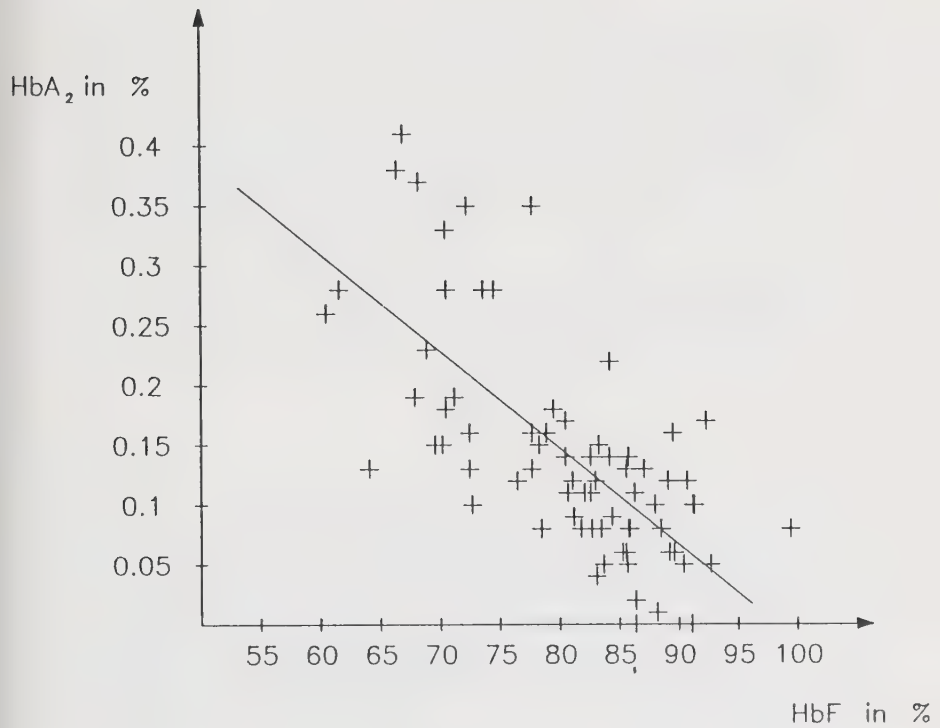


Abb. 9: Prozentualer Anteil von HbA₂ am Gesamtblutfarbstoff in Relation zum prozentualen Anteil von HbF (Einzelwerte und Regressionsgerade)

3.4 VERHÄLTNIS DER FAKTIONEN ZUEINANDER MIT ZUNEHMENDEM ALTER BZW. REIFE DES KINDES

Nachdem bereits gezeigt worden ist, daß und in welchem quantitativen Ausmaß HbA und HbA₂ im Laufe des kindlichen Entwicklungsprozesses steigen, während HbF absinkt, soll nun festgestellt werden, ob das Verhältnis dieser Fraktionen mit zunehmender Reife bzw. Alter des Kindes Änderungen unterlegen ist, d.h. ob HbA und HbA₂ relativ gleich schnell zunehmen oder nicht. Zu diesem Zweck wurden die erhaltenen Werte, geordnet nach SSW, Petrusa sowie Gewicht, zu jeweils drei Gruppen zusammengefaßt und deren Verhältnis-Mittelwerte miteinander verglichen.

Untersucht wurden folgende Verhältnisse:

1. HbA / HbA₂
2. HbF / HbA₂
3. HbF / HbA

zu 1.: HbA / HbA₂

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen über das Verhältnis HbA / HbA₂ im Laufe der Entwicklung.

Die Gruppen wurden 1. nach SSW (28-31 / 32-36 / 37-41)
2. nach Petrusa (28-31 / 32-36 / 37-41)
3. nach Gewicht (870-2000g / 2001-3000g / 3001-4300g)

gebildet.

Tab.2: Mittelwerte des Verhältnisses HbA / HbA₂

28-31 SSW 237:1	Petrussa 28-31 171:1	Gewicht 870-2000g 205:1
32-36 SSW 164:1	Petrussa 32-36 147:1	Gewicht 2001-3000g 157:1
37-41 SSW 129:1	Petrussa 32-36 131:1	Gewicht 3001-4300 131:1

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Quotient bei zunehmender SSW, Reife nach Petrusa bzw. zunehmendem Gewicht zugunsten des HbA_2 absinkt, HbA_2 also später, dafür dann aber relativ stärker als HbA zunimmt.

Um nachzuprüfen, ob dies auch mathematisch abzusichern ist, wurde der T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Dabei wurde kontrolliert, ob es sich zwischen der ersten und zweiten, der zweiten und dritten oder ggf. zwischen erster und dritter Gruppe um einen mathematisch signifikanten Abfall handelt.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3,4 und 5 zusammengestellt.

Es bedeuten: $\bar{s}$ = Standardabweichung

n = Anzahl der Werte

t = Prüfgröße

Zu beachten ist schließlich noch, daß sich für alle drei Reife-kriterien (SSW / Petrusa / Gewicht) in den sich entsprechenden Gruppen sehr ähnliche Verhältnisse HbA / HbA_2 ergaben.

SSW	28 - 31	32 - 36	37 - 41
Mittelwert	237,6	164,1	128,9
$\bar{s}$	184,4	65,6	43,4
n	10	24	24
t-Wert	1,736		2,192
Freiheitsgrade	32		46
Irrtumswahr-scheinlichkeit	> 5%		< 5%
Signifikanz	Nein		Ja

Tab. 3a: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten HbA / HbA_2 bei zunehmender SSW

SSW	28 - 31	37 - 41
Mittelwert	237,6	128,9
$\bar{s}$	184,4	43,4
n	10	24
t-Wert	2,764	
Freiheitsgrade	32	
Irrtumswahr- scheinlichkeit	< 1%	
Signifikanz	Ja	

Tab. 3b: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten
HbA / HbA₂ bei zunehmender SSW

Petrussa	28 - 31	32 - 36	37 - 41
Mittelwert	170,9	146,8	130,7
$\bar{s}$	63,1	63,0	55,0
n	6	16	16
t-Wert	0,798		0,770
Freiheitsgrade	20		30
Irrtumswahr- scheinlichkeit	> 5%		> 5%
Signifikanz	Nein		Nein

Tab. 4a: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten
HbA / HbA₂ bei zunehmender Reife nach Petrussa

Petrussa	28 - 31	36 - 41
Mittelwert	170,9	130,7
$\bar{s}$	63,1	55,0
n	6	16
t-Wert	1,470	
Freiheitsgrade	20	
Irrtumswahr- scheinlichkeit	> 5%	
Signifikanz	Nein	

Tab. 4b: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten
HbA / HbA₂ bei zunehmender Reife nach Petrusa

Gewicht	870 - 2000g	2001 - 3000g	3001 - 4300g
Mittelwert	204,6	157,1	131,1
$\bar{s}$	142,2	67,4	40,4
n	19	23	22
t-Wert	1,423	1,561	
Freiheitsgrade	40	43	
Irrtumswahr- scheinlichkeit	> 5%		> 5%
Signifikanz	Nein		Nein

Tab. 5a: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten
HbA / HbA₂ bei zunehmendem Gewicht

Gewicht	870 - 2000g	3001 - 4300g
Mittelwert	204,6	131,1
$\bar{s}$	142,2	40,4
n	19	22
t-Wert	2,32	
Freiheitsgrade	39	
Irrtumswahrscheinlichkeit	< 5%	
Signifikanz	Ja	

Tab. 5b: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten
HbA / HbA₂ bei zunehmendem Gewicht

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, nahmen zwar für alle Methoden der Reifeschätzung die Zahlen der Quotienten HbA / HbA₂ mit der Reife ab, doch war dieser Abfall nur bezüglich SSW und Gewicht statistisch zu sichern, nicht jedoch in der Aufteilung nach Petrusa. Angesichts der relativ großen methodischen Fehlerbreite in der Bestimmung so geringer Konzentrationen an HbA₂ (s. S.13) müßte vermutlich die Zahl der Untersuchungen beträchtlich erhöht werden, um die Aussagekraft auch mathematisch noch zu verbessern.

Trotz dieser Einschränkungen kann jedoch festgestellt werden, daß der Anstieg von HbA₂ in Relation zu HbA nicht geradlinig, wie es die Regressionsgerade in Abb. 8 (S.24) zeigt, erfolgt, sondern sich mit der Entwicklung beschleunigt.

zu 2.: $\text{HbF} / \text{HbA}_2$,

Da HbA_2 mit zunehmendem Alter des Kindes ansteigt, während HbF sinkt, ist es logisch, daß das Verhältnis der beiden Fraktionen mit fortgeschrittener Reife des Kindes steigt, d.h. zugunsten des HbA_2 -Anteils verschoben wird.

Tab. 6 zeigt die Abnahme des Verhältnisses am Beispiel der SSW, deren Werte wie schon oben erwähnt zu drei Gruppen zusammengefaßt wurden:

28 - 31 SSW	32 - 36 SSW	37 - 41 SSW
1457 : 1	837 : 1	491 : 1

Tab. 6: Mittelwerte des Verhältnisses $\text{HbF} / \text{HbA}_2$ bei steigender SSW

Um den aus Tabelle 6 ersichtlichen Abfall des Verhältnisses auch mathematisch belegen zu können, wurde wieder der T-Test durchgeführt; sein Ergebnis zeigt Tabelle 7:

SSW	28 - 31	32 - 36	37 - 41
Mittelwert	1456,7	837,4	491,2
$\bar{s}$	1157,1	531,2	231,7
n	10	24	24
t-Wert	2,16		2,93
Freiheitsgrade	32		46
Irrtumswahrscheinlichkeit	< 5%		< 1%
Signifikanz	Ja		Ja

Tab. 7: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten $\text{HbF} / \text{HbA}_2$ bei zunehmender SSW

Tabelle 7 bestätigt die schon oben gemachte Annahme: Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 5\%$ bzw. 1% fällt der Quotient HbF / HbA_2 bei zunehmender SSW ab.

zu 3.: HbF / HbA

Analog zu den unter 2. aufgeführten Gründen, ist es auch in diesem Fall zu erwarten gewesen, daß das Verhältnis zugunsten HbA verschoben wird.

Tabelle 8 verdeutlicht das Ergebnis anhand der Werte für die SSW:

28 - 31 SSW	32 - 36 SSW	37 - 41 SSW
6,6 : 1	4,6 : 1	4,35 : 1

Tab. 8: Mittelwerte des Verhältnisses HbF / HbA

Auch hier wurde wieder der Abfall des Quotienten mit Hilfe des T-Testes mathematisch überprüft (Tabelle 9)

SSW	28 - 31	32 - 36	37 - 41
Mittelwert	6,6	4,6	4,35
$\bar{s}$	2,95	2,17	2,42
n	10	24	26
t-Wert	2,20		0,383
Freiheitsgrade	32		48
Irrtumswahrscheinlichkeit	< 5%		> 5%
Signifikanz	Ja		Nein

Tab. 9: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten HbF / HbA bei zunehmender SSW

SSW	28 - 31	37 - 41
Mittelwert	6,6	4,45
$\bar{s}$	2,95	2,42
n	10	26
t-Wert	2,35	
Freiheitsgrade	34	
Irrtumswahrscheinlichkeit	< 5%	
Signifikanz	Ja	

Tab. 9b: T-Test zur Überprüfung der Abnahme des Quotienten
HbF / HbA bei zunehmender SSW

Tabelle 9a und 9b zeigen, daß sich zwischen der ersten und zweiten, sowie ersten und dritten Gruppe das Absinken des Quotienten auch mathematisch belegen läßt. Dies war nicht zwischen der zweiten und dritten Gruppe möglich.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ergebnisse folgende Annahmen unterstützen:

Die Quotienten HbA / HbA_2 , HbF / HbA_2 und HbF / HbA nehmen bei zunehmender Reife des Kindes ab, was bedeutet, daß die im Nenner stehenden Fraktionen relativ stärker ansteigen.

3.5 BEFUNDE DER 26. SSW

Die bisher besprochenen Fälle umfassten die 28. - 41. SSW. Zusätzlich wurden noch drei Kinder der 26. SSW untersucht, die folgende Werte zeigten:

	Gewicht	Petrussa	HbF	HbA	HbA ₂
1.)	840 g	26	99,4%	0,5%	0,08%
2.)	995 g	-	67,4%	32,0%	0,62%
3.)	990 g	26	79,5%	20,1%	0,36%

Im Vergleich mit den Meßwerten der Abbildungen 3 und 5 fallen die Ergebnisse für die Fälle 2 und 3 aus dem allgemeinen Trend heraus. Aus diesem Grund wurden auch die Werte der Kinder der 26. SSW nicht in die allgemeine Darstellung der Ergebnisse aufgenommen. Im übrigen s. Diskussion S.63.

4. DISKUSSION

4.1 EINLEITUNG

In der ontogenetischen Abfolge der Hämoglobine des Menschen gehen während der intrauterinen Entwicklung dem HbF noch embryonale Hämoglobine voraus. Insgesamt lassen sich 5 physiologische Hämoglobine unterscheiden (55,58):

1. Hb Gower, das wiederum aus zwei Fraktionen besteht:
dem Hb Gower I ($\zeta_2 \epsilon_2$) und
dem Hb Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$)
2. Hb Portland I ($\zeta_2 \gamma_2$) (48)

Alle drei werden als embryonale Hämoglobine zusammengefaßt, da sie hauptsächlich in diesem Entwicklungsstadium vorzufinden sind.

3. HbF ($\alpha_2 \gamma_2$), das fetale Hämoglobin
4. HbA ($\alpha_2 \beta_2$)
5. HbA₂ ($\alpha_2 \delta_2$)

Die beiden letzteren bilden die adulten Hämoglobine.

Schon die Namen der einzelnen Fraktionen geben Hinweise darauf, in welchem Abschnitt sie vornehmlich auftreten: Die embryonalen Hämoglobine werden etwa ab der 10. SSW von HbF abgelöst, wobei aber offensichtlich die ϵ -Ketten-Synthese nicht ganz eingestellt wird, da nach Untersuchungen von Kohne und Kleihauer (62) noch Spuren von Hb Gower II regelmäßig bei der Geburt nachgewiesen werden können.

Eine bis heute ungeklärte Frage ist die, wie die Expression der genetischen Information reguliert wird. Die Hämoglobine, die sich wie oben dargestellt ja in der Ontogenese gegenseitig ablösen und damit die Expression von unterschiedlicher genetischer Information zu bestimmten Zeitpunkten verkörpern, bieten sich aus diesem Grund als besonders geeignetes Modell zur Klärung des Mechanismus, nach dem Gene an- und abgeschaltet werden, an.

Viele Theorien, auf die noch eingegangen werden soll, sind dazu entwickelt worden. Genau genommen handelt es sich um das Problem, durch welchen Mechanismus die Synthese der verschiedenen Polypeptidketten an- oder abgeschaltet wird.

Zunächst ist es aber notwendig, eine möglichst genaue und vollständige Analyse der Ontogenese der aus ihnen bestehenden Hämoglobine durchzuführen. Mit Hilfe dieser ist es dann möglich, die eine oder andere Theorie zu stützen oder aber als unwahrscheinlich einzustufen.

In diesem Rahmen muß auch die ontogenetische Entwicklung des HbA₂ eingepaßt werden; sie verläuft nach den eigenen Untersuchungen nicht synchron mit der von HbA, sondern folgt ihr etwas verzögert.

Im folgenden sollen nun die eigenen Untersuchungen über die Höhe und Entwicklung der einzelnen Hämoglobine, besonders des HbA₂, während der Fetalzeit, mit entsprechenden Angaben in der Literatur verglichen und diskutiert werden. Anschließend wird besprochen, welche Theorie über die An- und Abschaltung der Gene mit diesem Verlauf harmoniert.

4.2 VERGLEICH EIGENER ERGEBNISSE MIT ANGABEN AUS DER LITERATUR

4.2.1 HbF und HbA

Untersuchungen über den Verlauf der Synthese von HbA und HbF in der Fetalzeit stellten erstmals Huehns und Shooter 1965 (46), sowie Kleihauer 1970 (57) an, die die Globin-Ketten-Synthese von 5-6 Wochen Gestationsalter an bis hin zu einigen Wochen nach der Geburt analysierten. Wood veröffentlichte nach ihren Angaben 1976 eine Skizze über den Verlauf der Kettensynthese (109). Demzufolge haben die α - und γ -Kettensynthese um die 5. Gestationswoche ca. 20% bzw. 30% der totalen Kettensynthese erreicht,

zu der zu diesem Zeitpunkt auch noch die ϵ -Kettensynthese kommt. Die Produktion der ersteren steigt dann um die 6. Woche steil an und erreicht für die α -Ketten ca. 50%, für die γ -Ketten etwa 45% der gesamten Kettensynthese.

Während die α -Kettensynthese im folgenden auf dieser Höhe bleibt, (α -Ketten sind ja sowohl am HbF wie auch am HbA beteiligt), gilt dies für die γ -Kettensynthese nur bis etwa zur 30. SSW; von da an fällt sie steil ab, um sich ab der 12. Lebenswoche langsam asymptotisch einem sehr niedrigen Wert zu nähern.

Die β -Kettensynthese verhält sich zur γ -Ketten-Produktion genau spiegelbildlich: D.h. nach einem Beginn etwa um die 5. Gestationswoche bleibt sie längere Zeit auf einem niedrigen Niveau, steigt dann in den 6-8 Wochen vor und nach der Geburt steil an und nähert sich ab der 12. Lebenswoche asymptotisch knapp den 50% der gesamten Hämoglobin-Kettensynthese. Die restlichen Prozentwerte werden von der δ -Kettensynthese, sowie minimal von der der γ -Ketten, beansprucht. Für die δ -Ketten nahmen die Autoren einen langsamen linearen Anstieg an, dessen Beginn nicht genau zu ersehen ist.

Nach diesem Schema stellt das HbF ab ca. der 6. Gestationswoche die Hauptfraktion, bleibt relativ kontinuierlich auf einem hohen Niveau, um dann um die 30. SSW abzufallen, während das HbA, das bis dahin einen relativ konstanten niedrigen prozentualen Anteil ausmachte, dann schnell ansteigt und einige Monate nach der Geburt das HbF als Hauptfraktion verdrängt hat. Das HbF verbleibt jenseits des ersten Lebenshalbjahres nur noch in geringen Mengen (8,23). Wood beziffert den HbF-Anteil auf dem Höhepunkt seiner Synthese, also ca. zwischen der 8. und 30. SSW, auf etwa 90%. Der HbA-Anteil soll in diesem Zeitraum bei ca. 5-10% liegen (43, 56,88). Auch Bard et al. (6) fanden bei Frühgeborenen der 30.-36. SSW Werte für HbA in dieser Größenordnung. Ebenfalls zu dem gleichen Ergebnis führten die unveröffentlichten Untersuchungen von Wood und Stamatoyannopoulos bei 8-20 Wochen alten Feten mit fluoreszierenden Anti-HbA-Antikörpern (109). Das Umschalten von HbF auf HbA, der sogenannte "Switch", wird in der Literatur um

die 32.-34. SSW angesetzt (5,6).

In den gleichen Veröffentlichungen (5,6) wird aber außerdem auf den linearen Zusammenhang zwischen Gestationsalter und den relativen Anteilen von HbF und HbA hingewiesen, die im Nabelschnurblut von Kindern der 26. bis 43. SSW gemessen wurden. Zu diesem Schluß kam schon Bischoff 1925 (13).

Wood (109) erklärt die weiten Spannen, die für HbF im Neugeborenenblut in der Literatur immer wieder angegeben werden (83,110) einmal mit der Schwierigkeit, das Gestationsalter bzw. die Maturität genau festzulegen und zweitens der relativen Ungenauigkeit der Methoden zur Bestimmung hoher HbF-Konzentrationen. So gibt Betke (8) 1968 Werte zwischen 60-80% HbF, und entsprechend 20-40% HbA im Neugeborenenblut an. Weatherall et al. (108) beziffern den HbF-Gehalt von der 8. bis 30. Gestationswoche auf ca. 90%. Der Anteil von HbF soll dann in der 30.-34. Woche beginnen abzufallen und bei der termingerechten Geburt Werte zwischen 50-60% erreichen. Mason et al. fanden in einer Studie 1982 (73) bei einem Tag alten Neugeborenen HbF-Anteile von $69,6 \pm 8,6\%$. Mit Hilfe der Alkali-Denaturation erhielten Iolascon et al. 1983 (53) bei 30 Neugeborenen Werte von durchschnittlich $66,6 \pm 7,6\%$ HbF. In einer Veröffentlichung von Felicetti et al. (32) wird ein durchschnittlicher HbF-Gehalt im Nabelschnurblut von 919 Neugeborenen von ca. 75% angegeben, wobei aber Kinder der 32.-45.SSW erfaßt wurden.

Die Werte aus der Literatur stimmen mit den eigenen Ergebnissen sehr gut überein:

Der durchschnittliche HbF-Gehalt der 26. SSW lag bei ca. 85%, entspricht also etwa den 90% aus den o.g. Untersuchungen. Ebenfalls konnte der Zusammenhang zwischen HbF-Anteil und Gestationsalter bestätigt werden. Ein gleicher Zusammenhang ergab sich zudem noch für HbF in Bezug auf das Geburtsgewicht bzw. die Reife nach Petrusa.

Wie auch in der Literatur angegeben, wiesen die prozentualen HbF-Anteile der Neugeborenen weite Schwankungen auf, die nicht nur

auf die unterschiedliche Reife der Kinder (28.-41. SSW) zurückzuführen war, sondern auch bei Kindern gleicher Reife nach Petrusa zu finden waren.

Für die termingerecht geborenen Kinder ergab sich ein Mittelwert von ca. 76% HbF.

Die eigenen Meßwerte liegen also etwas höher als vergleichbare Angaben aus der Literatur. Dabei ist zu berücksichtigen, daß sie, wie schon erwähnt, aus methodischen Gründen um 15% nach oben korrigiert wurden. Ob dies bei den zitierten Beispielen aus der Literatur ebenfalls vorgenommen wurde, sofern es sich auch um die Alkali-Denaturation zur HbF-Bestimmung handelte, war nicht zu ersehen. Ohne die Korrektur wiederum wären dann allerdings die Werte für die 28. SSW stärker von denen aus der Literatur nach unten abgewichen.

Insgesamt war also der festgestellte Abfall des HbF im Verlauf der Fetalzeit etwas weniger steil als in den o.g. Untersuchungen. Ob es sich vor der 30. bzw. 32. SSW statt um einen Abfall um eine kontinuierlich gleich bleibend hohe Konzentration von HbF handelt, wie aufgrund der Ketten-Synthese-Analyse (s.o.) angenommen werden müßte, ist aus den eigenen Untersuchungen aufgrund der geringen Fallzahl weder abzustreiten noch zu bestätigen. Der HbA-Anteil ergibt sich reziprok zu den HbF-Werten: In der 28. SSW also ca. 15%, ansteigend auf ca. 24% in der 40. SSW.

Auch die gemessenen HbF-Werte bei den Erwachsenen liegen in Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur: Betke (8) gibt einen HbF-Anteil kleiner 0,5% an; andere Veröffentlichungen (14) sprechen von Werten im Bereich von 0,4%. Nach Chernoff (22) sind Werte bis 0,65% HbF im adulten Blut normal. Die eigenen Messungen ergaben im Mittel etwa HbF-Anteile von 0,2%.

4.2.2 HbA₂

Über das HbA₂ ist, was sein Vorkommen bzw. seine Entwicklung im fetalen Blut betrifft, erst sehr viel später und wesentlich weniger in der Literatur berichtet worden.

1957 untersuchten Josephson et al. (54) Nabelschnurblut mit der Stärkeblockelektrophorese: Die Werte die sie für HbA₂ ermittelten, lagen im Schnitt bei 0,88% und damit um einiges höher als die späterer Untersuchungen, wie z.B. von Horton et al. 1962 (44), die, ebenfalls mit Stärkeblockelektrophorese, Werte von 0,1-0,4% fanden.

Noch 1969 waren die Angaben über HbA₂ im fetalen bzw. Neugeborenenblut oft nur sehr pauschal: Weatherall et al. (108) erwähnten "sehr kleine" HbA₂-Mengen bei ausgetragenen Neugeborenen und stellten fest, daß der genaue Zeitpunkt der Aktivierung der δ -Kettensynthese unsicher sei. Heller et al., die im gleichen Jahr eine Untersuchung von Nabelschnurblut mit Immunfluoreszenz-Seren veröffentlichten (39), stellten bei einer großen Anzahl der Blutzellen hohe HbF-, verbunden mit geringen HbA₂-Konzentrationen fest, fanden aber auch Zellen mit stärkerer Fluoreszenz, d.h. also höheren HbA₂-Gehalten. Zwar konnten sie gut die Verteilung von HbA₂ auf die Zellen zeigen, genaue Mengenangaben waren aber mit dieser Methode nicht möglich.

Nur Erdem und Aksoy stellten schon 1969 (31) genauere Messungen des HbA₂ im Blut von 1 - 6 Monate alten Säuglingen an. Sie fanden dabei Konzentrationen zwischen 0,5 - 1,0% für die 1 Monat alten Kinder, und Erwachsenenwerte, d.h. 2,0 -2,5%, etwa bei einem Lebensalter von 6 Monaten.

Andere Studien bestätigen letzteres (72) oder setzen den Termin sogar etwas früher an (107). 1978 veröffentlichten Serjeant et al. (103) ihre Ergebnisse über den Verlauf des HbA₂ bei einer Woche bis drei Jahre alten Negerkindern. Auch sie bestätigten damit in etwa die o.g. Untersuchungen über den Verlauf des HbA₂. Ihr jüngstes, eine Woche altes Kind hatte einen HbA₂-Anteil von 0,1%. Eine weitere Studie zum gleichen Thema mit ebenfalls ganz ähn-

lichen Resultaten lag 1980 von Schettini et al. (101) vor. In der Rehabilitationsarbeit von Kohne (61) heißt es, daß das HbA₂ regelmäßig jenseits der 34.-35. Entwicklungswoche gebildet würde. Bei Neugeborenen maß sie mit der Chromatographie mit DEAE-Cellulose HbA₂-Anteile zwischen 0,19 - 0,60%.

Erst 1984 beschäftigten sich Felicetti et al. (32) in ihrer Veröffentlichung mit dem Verlauf des HbA₂ in der Fetalzeit, gemessen an nahezu 1000 Neu- und Frühgeborenen der 32. - 45. Gestationswoche. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist dies auch die einzige Literaturstelle, die speziell zu diesem Thema zu finden ist. Ihre mit der Mikrochromatographie-Methode nach Efremov et al. (29) bestimmten HbA₂-Werte lagen im Mittel bei $0,27 \pm 0,02\%$, die des HbF bei $74,69 \pm 0,25\%$.

Ein Vergleich mit eigenen Werten zeigt nun, daß diese für HbA₂ im Mittel etwas tiefer liegen: Alle untersuchten Kinder hatten zusammen durchschnittlich 0,14% HbA₂, wurden nur die Kinder der 32. - 41. SSW berücksichtigt, erhöhte sich der Wert auf 0,16%. Dabei ist einmal zu bedenken, daß die eigenen Messungen auch beim Erwachsenenblut im Vergleich mit Angaben aus der Literatur etwas nach unten abwichen, andererseits aber Felicetti et al. Kinder bis hinauf zur 45. Gestationswoche untersucht haben. Für das HbF gilt natürlich bezüglich der untersuchten SSW das gleiche; werden aber wieder nur die Werte der 32. - 41. SSW aus den eigenen Messungen berücksichtigt, ergibt sich ein Mittelwert von 78,7% HbF. Das ist, wenn den zusätzlichen Wochen bis zur 45. SSW von Felicetti et al. wieder Rechnung getragen wird, fast identisch mit ihren Werten.

4.2.3 Verhältnis HbA / HbA₂ während der Fetalzeit

Auch über diesen Punkt sind nur bei Felicetti et al. (32) Angaben zu finden:

Sie berichten von einer Änderung des Verhältnisses von 101 : 1 in der 32. SSW auf 76 : 1 in der 45. SSW. Die Relation bei Er-

wachsenen beträgt, legt man 2,5% HbA₂ zugrunde, ca. 40 : 1. Den eigenen Ergebnissen zufolge (siehe auch oben) ergaben sich folgende Relationen:

28. - 31. SSW: 237 : 1

32. - 36. SSW: 164 : 1

37. - 41. SSW: 129 : 1

Sie bestätigen die von Felicetti et al. aufgezeigte Tendenz, eines kontinuierlich höheren HbA₂-Anteils, spiegeln allerdings zugleich auch die für HbA₂ niedriger gemessenen Werte wieder: Bei den eigenen Untersuchungen ließ sich zudem auch mathematisch eine Korrelation zwischen der Höhe des HbA₂ und der von HbA bzw. HbF nachweisen (s. Kapitel 3.3.1 und 3.3.2).

4.2.4 Verhältnis von HbF zu HbA₂

Eine Untersuchung über den Zusammenhang zwischen HbF und HbA₂ im Nabelschnurblut ist 1962 von Horton et al. (44) gemacht worden. Aus seinen Skizzen ist zu ersehen, daß bei einem Prozentsatz von ca. 65% HbF etwa 0,4% HbA₂ vorliegen sollen, bei 90% HbF waren die entsprechenden HbA₂-Werte bei ca. 0,13%. Die Anteile, die aus dem eigenen Material berechnet wurden, lagen für 65% HbF bei 0,27% HbA₂ und für 90% HbF bei 0,067% HbA₂ durchschnittlich. Auch hier sind die HbA₂-Anteile der eigenen Untersuchungen also niedriger.

4.2.5 Abhängigkeit des HbA₂ von der Reife des Kindes

Auch Felicetti et al. (32) untersuchten, ob zwischen der Höhe des HbA₂ und der Reife des Kindes ein Zusammenhang besteht. Sie verwendeten dazu das Gestationsalter, Geburtsgewicht, Länge, sowie Kopfumfang des Kindes, konnten aber in keinem der genann-

ten Fälle einen statistischen Zusammenhang nachweisen. In der vorliegenden Untersuchung gelang dies jedoch sowohl für die SSW wie auch das Geburtsgewicht und Petrusa (s. Kapitel 3.2.3). Die eigenen Ergebnisse sprechen also stark für eine Abhängigkeit des Anteils von HbA_2 am Gesamtblutfarbstoff von der Reife des Kindes.

4.3 ZUM PROBLEM DER REGULATION DER GEN-EXPRESSION

4.3.1 Einleitung

Wie schon erwähnt bieten die Hämoglobine ein sehr geeignetes Modell für Studien über die Regulation der Gen-Expression, da ihre Synthese im Laufe der Ontogenese offensichtlich sukzessiv "an-" bzw. "abgeschaltet" wird.

Um den zugrundeliegenden Mechanismus zu erforschen, ist es zunächst wichtig, die strukturellen Gegebenheiten aufzuklären, d.h. in diesem Fall die Gene, die für die Kodierung der Globin-Ketten verantwortlich sind, zu lokalisieren und evtl. strukturelle Besonderheiten oder Übereinstimmungen in ihrer Nachbarschaft aufzufinden. Dies ist im Laufe der letzten Jahre und Jahrzehnte weitgehend gelungen.

Für die Vorstellungen, die man verfolgte, waren Modelle zur Evolution der Gene wichtig: 1961 stellte z.B. Ingram die Theorie auf, daß alle vier physiologischen Globine des Menschen sich aus einem primitiven, myoglobin-ähnlichen Häm-Protein entwickelt haben (50), was gleichzeitig eine Zunahme der genetischen Information bzw. ihrer Komplexität im Laufe der Evolution bedeutet. Anlaß zu dieser Annahme gaben die auffälligen chemischen und strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Ketten. Durch Duplikation und Translokation bildeten sich, wie Ingram annahm, vier Gene, jeweils eines für eine Globin-Ketten-Art. Aus dem Grad ihrer Ähnlichkeit untereinander und Vergleichen mit Tieren niedrigerer Evolutionsstufen, stellte er ferner eine Reihenfolge ihrer Entwicklung auf: Je mehr Übereinstimmungen vorliegen, desto kürzer dürfte das Ereignis der Duplikation zurückliegen. Es ergab sich folgende Reihenfolge:

$$\alpha - \gamma - \beta - \delta$$

Für das ϵ -Gen wird angenommen, daß es aus einer Duplikation des γ -Gens hervorgegangen ist (30),

Die γ -Ketten selbst sind wiederum nicht einheitlich, sondern weisen zwei Varianten auf: Position 136 kann entweder von Gly-

cin (G_γ) oder Alanin (A_γ) eingenommen werden (102). Es wird angenommen, daß sie Produkte zweier nicht-alleler Gene sind.

Des weiteren waren folgende Fragen zu klären:

1. Wo, d.h. auf welchen Chromosomen, und
2. in welcher Anordnung die Gene sitzen, sowie
3. wieviel Gen-Orte pro Ketten-Art existieren.

Zu 1.: Zunächst einmal konnte aus der Tatsache, daß bei anomalen Hb-Varianten sich die verantwortlichen Anomalien der α - oder β - Ketten unabhängig voneinander vererben, geschlossen werden, daß die den Ketten entsprechenden Gene sich auf verschiedenen Chromosomen befinden. Deisseroth et al. konnten dies 1976 (26) auch experimentell bestätigen. Andererseits konnte aus dem Vorkommen von Hb-Varianten, die offensichtlich durch Gen-Fusionen bei ungleichem Crossing-over entstehen, (wie z.B. Hb-Lepore oder Hb-Kenya), auf eine enge Verknüpfung der Gene für γ -, β - und δ -Globine zusammen auf einem Chromosom geschlossen werden (65,110). Während Price et al. (93) noch 1972 mit Hilfe radioaktiv markierter m-RNA die Chromosomen 2 (für α -Ketten) und 4 oder 5 (für die "non- α "-Ketten, d.h. β -, γ - und δ -Ketten) glaubten identifizieren zu können, gelang es Deisseroth et al. 1977 (24,25) zu zeigen, daß die α -Ketten-Gene auf Chromosom 16 liegen und die entsprechenden Gene für die Gruppe der β -Ketten auf Chromosom 11. Sie benutzten dazu Zell-Hybride aus Menschen- und Mäusezellen, in denen sie die Chromosomen, sowie die gebildeten Globine identifizierten.

Zu 2.: Auch die Anordnung der Gene auf den Chromosomen konnte aufgeklärt werden: für die "non- α "-Gruppe ergab sich eine Reihenfolge:



(34,35,66,75).

Für die α -Gruppe lautet die Anordnung:



(25), wobei sich dazwischen jeweils noch "Pseudo-Gene", die kei-

ne Polypeptidketten kodieren, aber den Struktur-Genen ähnliche Sequenzen aufweisen, eingestreut befinden (30).

Auffallend ist die Gleichsinnigkeit zwischen der Reihenfolge der Gen-Evolution (s.o.), ihrer Anordnung auf den Chromosomen, sowie ihrer Expression im Laufe der Ontogenese; am 5'-Ende befinden sich jeweils die "ältesten" bzw. ersten Globine der Ontogenese, am 3'-Ende die jüngsten. Evtl. mag dies Bedeutung im Hinblick auf ihre Regulation haben.

Zu 3.: Auch zu diesem Punkt, wieviel Gene für ein Globin verantwortlich sind, gibt es bereits Resultate:

1961 stellten Baglioni et al. (4) die Hypothese auf, daß das α -Gen sowohl für HbF wie auch für HbA identisch sei, was Horton 1962 auch bestätigte (44). Für den Mechanismus der Gen-Regulation bedeutet dies, daß es sich beim "Switch" vom fetalen auf das adulte Hb nur um eine Änderung der Gen-Regulation von der γ - zur β -Kette handelt.

Da es außerdem zwei Typen von γ -Ketten gibt (s.o.)(102), war ferner offensichtlich, daß mindestens zwei Gene das γ -Globin kodieren. Ähnliche Annahmen machten Lehmann und Carrell (67) für die α -Gene aufgrund der Beobachtung, daß α -Gen-Mutanten bei Heterozygoten oft nur zu 20% auch als Hb-Varianten exprimiert werden. Was das Gen für die β -Ketten angeht, so betonten Rucknagel et al. 1974 (100), daß es sich wahrscheinlich nur um einen Gen-Ort handelt, da u.a. Heterozygote für β -Mutanten auch entsprechend 30-40% anomale Hb-Varianten zeigen.

Die äquivalente Annahme gilt nach Lang et al. auch für das δ -Gen (65). Nienhuis et al. faßten das Ergebnis noch einmal zusammen (81).

- Jeweils ein Gen-Ort für die β - und δ -Gene (das entspricht je zwei Genen bei einem diploiden Chromosomensatz).
- (mindestens) zwei Gen-Orte für die δ -Ketten (82,94)
- (mindestens) zwei Gen-Orte für die α -Ketten bei vielen Menschen, bei anderen womöglich jedoch nur ein Gen-Ort.

4.3.2 Bisherige Hypothesen

Zur Erforschung der Regulation dieser Gene sind mehrere Ausgangspunkte möglich:

1. Regulation durch humorale Faktoren der Umgebung:

- Substanzen, die sich beispielsweise im Serum befinden, könnten eine Umschaltung beeinflussen bzw. auslösen.

2. Regulation auf zellulärer Ebene:

- während der Ontogenese lösen sich verschiedene Zell-Klone ab, die unterschiedliche "Gen-Programme" aufweisen.
- während der Reifung einzelner Zellen von der Stammzelle zum reifen Erythrozyten werden zu unterschiedlichen Zeiten und verschieden lang die einzelnen Hämoglobine synthetisiert.

3. Regulation auf molekularer Ebene:

- Veränderungen der Chromatinstruktur lassen verschiedene Gen-Expression zu:
(z.B. durch Auftreten neuer chemischer Gruppen an der DNA oder Änderung ihrer räumlichen Struktur).
- Verschiedene Stabilität der m-RNA für die jeweiligen Ketten-Typen.
- Verschiedene Affinität der Ketten zueinander.

Zu Punkt 1:

Grundlegende Befunde, die die Möglichkeit einer Beeinflussung der Gen-Expression durch Umgebungsfaktoren belegen, wurden von der Arbeitsgruppe um Stamatoyannopoulos erhoben:

1982 beschrieben Papaynnopoulou et al. (85), daß Schaf-Serum in der Lage sei, in vitro einen "Switch" von der HbF- zur HbA-Synthese in menschlichen Erythrozyten-Vorläuferzellen in Gang zu setzen. Dabei war eine weitere wichtige Beobachtung, daß dies nur in Zellen von bereits geborenen Kindern, nicht aber in fetalen Zellen

gelang. Daraus schlossen die Autoren, daß die Erythrozyten-Vorläuferzellen erst im Laufe der Ontogenese die Fähigkeit erwerben, auf humorale Faktoren der Umgebung zu antworten. Dies wiederum setzt eine Änderung im Stammzell-Programm voraus, die diese veränderte Antwort, evtl. z.B. über neue Rezeptoren, ermöglicht.

Stamatoyannopoulos et al. (105) wiesen zudem darauf hin, daß der Faktor hauptsächlich während der Entwicklung der Erythrozyten-Vorläuferzellen wirksam sei und im übrigen keine Helferzellen benötigte. Außerdem entkräfteten sie die Hypothese, daß es verschiedenen "programmierte" Erythrozyten gibt, da geteilte Kulturen sich immer entsprechend dem äußeren Stimulus, also entsprechend dem humoralen Faktor, verhielten und sich somit nicht nach einer ihnen innewohnenden Determination richteten.

Des weiteren konnten Papayannopoulou et al. Ergebnisse veröffentlichen (87), nach denen auch die erhöhte HbF-Synthese bei "persistierendem HbF" (d.h. einer Anomalie, bei der auch beim Erwachsenen noch fetales Hämoglobin gebildet wird), durch diesen humoralen Faktor abgeschaltet werden kann, obwohl es sich bei dieser hämatologischen Anomalie erwiesenermaßen um eine Gen-Mutation handelt. Denkbar wäre daher, daß die Mutation bei "persistierendem HbF" die Antwort der Zelle auf den "Umgebungsfaktor" im Schaf-Serum, der wiederum den "Switch" kontrollieren bzw. induzieren soll, modifiziert bzw. erschwert. Sie berichten weiterhin, daß die Vorläuferzellen bei weiterer Differenzierung zum Erythrozyten offensichtlich die Fähigkeit, HbF produzieren zu können, weitgehend verlieren.

1983 stellten Stamatoyannopoulos et al. (105) aus den von ihnen gewonnenen Erkenntnissen ein Modell zum Umschalt-Mechanismus der Hämoglobine vor:

Da sie zeigen konnten, daß nur Zellen bestimmter Reifestadien in der Lage waren, auf den (freilich vorerst nur im Schaf-Serum festgestellten) humoralen Faktor zu antworten, kombinierten sie die Vorstellung einer Regulation mittels "innerer Uhr" mit der einer durch einen humoralen Faktor vermittelten Regulation. D.h. sie

nahmen an, daß die Zellen im Laufe ihrer Ontogenese die Fähigkeit erwerben, (evtl. durch neue Rezeptoren), auf einen humoralen Faktor zu antworten, der die Expression des HbF unterdrücken kann. Möglicherweise könnte dies durch Änderung der molekularen DNA-Struktur geschehen (s.u.). Ist der "Switch" einmal vollzogen, ist das Programm sozusagen irreversibel geändert: Stamatoyannopoulos et al. (105) zeigten, daß Zellen Erwachsener, die in fetaler Umgebung wachsen und reifen, nicht wieder plötzlich HbF synthetisieren konnten.

Dies stimmt auch mit Beobachtungen von Wood (111) überein, der feststellte, daß Mäusezell-Faktoren in Erythroleukämie-Zellen die α - und β -Ketten-Synthese wieder aktivieren konnten, nicht jedoch die von γ - und δ -Ketten, woraus er auf einen gewissen "erwachsenen Charakter" der Zellen schloß.

Zu Punkt 2:

1974 wiesen Weatherall et al. (108) in Bestätigung älterer Angaben von Betke 1958 (7) darauf hin, daß die Hämoglobin-Umschaltung nicht dadurch erklärt werden könne, daß die Erythrozyten-Stammzellen im Laufe der Ontogenese aus verschiedenen Organen (Dottersack, Leber, Milz und Knochenmark) stammen. Sie negierten damit die Hypothese, daß Zellen verschiedener Herkunft verschiedene "Hämoglobin-Programme" besäßen. Dennoch wurde 1983 noch einmal von Alter und Campbell (2) ein klonales Modell vorgeschlagen: Sie postulierten einen fetalen Erythrozyten-Vorläufer, der die Fähigkeit für die Synthese von hauptsächlich HbF habe, sowie einen adulten Erythrozyten-Vorläufer, der vorwiegend, aber nicht ausschließlich, auf die Synthese von HbA programmiert sei. Im Laufe der Ontogenese sollten die fetal programmierten Vorläufer kontinuierlich durch adulte Vorläufer ersetzt werden. Während Zellen der fetalen Kolonien von humoralen Faktoren der Umgebung unbeeinflusst blieben (wie z.B. von Erythropoetin), sollen die adulten in ihrer Hb-Synthese dadurch moduliert werden können. HbF im Erwachsenen-Blut würde demnach

auf die geringe Synthese durch den adulten Klon zurückzuführen sein.

Andererseits müßten aber auch die fetalen Klone eine minimale Fähigkeit zur β -Ketten-Synthese haben, da das HbA schon sehr früh in der Ontogenese auftaucht: Papayannopoulou et al. wiesen β -Ketten mit fluoreszierenden Antikörpern schon in 38 Tage alten Embryos nach (86).

Viele Beobachtungen sind gemacht worden, daß die Hämoglobin-Expression direkt mit dem Reifegrad der Erythrozyten-Vorläuferzellen in Zusammenhang steht. 1972 machten Roberts et al. (97), 1983 Dover et al. (28) entsprechende Beobachtungen. 1977 stellten Papayannopoulou et al. (84) eine entsprechende These auf: Die phänotypische Expression in Erythrozyten-Klonen sollte stark von dem Differenzierungsgrad der Stammzellen, aus denen sie sich entwickelt hatten, abhängig sein. Die Entscheidung, in welchem Ausmaß die Erythrozyten HbF produzierten, würde ihrer Meinung nach in vitro im Stadium der sogenannten "burst-forming-units" fallen, unter denen man unreife Erythrozyten-Vorläuferzellen, die in speziellen Kulturmedien Klone aus einigen tausend Erythroblasten bilden, versteht. Demnach spiegele der Verlauf der HbF-Synthese in der Ontogenese das Erreichen zunehmend höherer Differenzierungsstufen als eine Art Entwicklungsfortschritt wieder: Je höher der erreichte Differenzierungsgrad, desto geringer die HbF-Produktion. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen 1984 Alter und Campbell (2), die die Expression der β -Minor-Komponente (der humanen γ -Kette vergleichbar) in Mäuse-Erythrozyten-Kolonien beobachteten: Auch sie konnten feststellen, daß die Expression des Hb-Minor im Verlauf der Erythrozyten-Entwicklung abnahm. Rifkind et al. unterstützten 1983 (96) diese Ansicht und stellten die Hypothese auf, daß Änderungen der Chromatin-Struktur (s.u.) in der Globin-Gen-Region mit erhöhter Transkription verknüpft sind und weiterhin typisch für ein bestimmtes Reifestadium der Erythrozyten-Zell-Linie. Außerdem beschrieben sie Substanzen, wie z.B. Buttersäure, die in der Lage seien, sowohl eine Ausdifferenzierung der Vorläufer-Zellen, wie auch eine Erhöhung in der

Globin-Gen-Transkription zu induzieren; ein weiterer Hinweis auf die Verknüpfung beider Prozesse.

Schließlich sollen noch Beobachtungen von Nathan 1983 (80) erwähnt werden, die ebenfalls diese Annahme bestätigen: Während einer "Streß-Erythropoese", d.h. wenn bereits unreife Erythrozyten-Vorläufer in die endgültige Differenzierung eintreten müssen, anstatt normal auszureifen, erscheinen HbF-haltige Erythrozyten in der Zirkulation. Diese Zellen können als Produkte einer Differenzierung zum Erythrozyten von einem niedrigeren Reifegrad aus gesehen werden; d.h. die Reife der Vorläuferzellen, aus der sich der Proerythroblast entwickelt, spielt eine große Rolle in seiner Hämoglobin-Expression.

Zu Punkt 3:

Es konnten einige Veränderungen der Chromatin-Struktur entdeckt werden, die mit veränderten Hämoglobin-Mustern einhergehen: Groudine et al. veröffentlichten 1983 (37,38) Ergebnisse, denen zufolge der "Switch" von HbF zu HbA mit dem Verlust von 5'-hypersensitiven Regionen in der Nachbarschaft der γ -Struktur-Gene verknüpft sei. Diese DNase hypersensitiven Stellen fanden sie in früheren Entwicklungsstufen in der Nähe aller Globin-Struktur-Gene. Das Verschwinden solcher Abschnitte könnte also das "Abschalten" des entsprechenden Struktur-Gens bedeuten, wobei der Mechanismus, nach dem die anderen Gene "angeschaltet" würden, noch nicht geklärt wäre.

Mit dem klonalen Modell verknüpft (s.o.), hieße das, daß die fetalen Vorläufer-Zellen noch die hypersensitiven Regionen um das γ -Struktur-Gen besäßen, die adulten jedoch nicht mehr. Eine weitere signifikante Auffälligkeit, die mit veränderter Hämoglobin-Expression einherzugehen scheint, ist der Methylierungsgrad der DNA. 1983 schlugen Busslinger et al. (20) vor, daß die Abwesenheit von DNA-Methylation möglicherweise eine notwendige, wenn auch nicht ausreichende Bedingung für die Gen-Aktivität sein solle. Methylation könnte demnach die Transkription verhindern.

Ihre Experimente mit Globin-Genen bestätigten diese Theorie. In einem anderen Artikel des gleichen Jahres (21) konnten sie zudem zeigen, daß nur auf ganz bestimmten Abschnitten der DNA eine Regulation mittels Methylierung möglich ist, nämlich auf der dem 5'-Ende des Gens benachbarten Region.

Bei Kaninchen β -Globin-Genen konnten auch bestimmte Methylierungs-Muster nachgewiesen werden.

Auch Mavilio et al. (74) kamen in dem gleichen Jahr zu dem Schluß, daß eine direkte Korrelation zwischen der Hypomethylierung in der engen Nachbarschaft der Globin-Gene und deren Expression in embryonalen, fetalen und adulten Erythroblasten bestünde. Eine ungleiche Demethylierung könnte eine asynchrone Umschaltung einzelner Erythroblasten-Klone widerspiegeln. Interessant ist zudem, daß sie keine Korrelation zwischen Methylierung und Expression in Bezug auf das δ -Gen feststellen konnten. Sie schlagen daher einen anderen Regulations-Mechanismus für das δ -Gen vor.

Welcher Faktor die Methylierung steuert, ist noch unerforscht. Eine Demethylierung der DNA ist *in vitro* mit 5-Azacytidin möglich. De Simone et al. (27) zeigten, daß nach Gabe dieser Substanz bei Pavianen die Produktion von fetalem Hb gesteigert wird. Dasselbe stellten Ley et al. (69) sogar bei einem Patienten mit schwerer β -Thalassämie fest.

Ein letzter Vorschlag zur Regulation über die Chromatin-Struktur kommt von Mc Ghee et al. (36): Sie beobachteten die höhere Ordnungsstruktur des Chromatins und kamen zu dem Schluß, daß Gen-Aktivität mit Änderungen dieser Strukturen einhergehe. Diese Änderungen sollen lokaler Art sein, Umordnungen langer Chromatin-Abschnitte konnten sie dagegen nicht feststellen.

Eine Zusammenfassung dieser Struktur-Aspekte als Ausdruck verschiedener Expression findet sich bei Wood et al. 1983 (111). Einen Einfluß auf die Höhe der einzelnen Hämoglobin-Fraktionen können außerdem noch folgende Faktoren haben:

Ross et al. veröffentlichten 1983 ihre Messungen an m-RNA für β - und δ -Ketten und stellten dabei fest, daß die β -m-RNA eine

wesentlich längere Halbwertszeit besaß (98). Möglicherweise unterliegt die δ -m-RNA einem höheren Abbau, weil ihre Translation an Ribosomen häufiger durch Unsinn-Codons gestoppt wird. Auf alle Fälle würde diese Tatsache aber die Höhe der jeweils synthetisierten Ketten beeinflussen.

Ein weiterer Faktor, der die Verteilung der Hämoglobine beeinflusst, ist die Affinität der Ketten zueinander: Da α -Ketten sowohl für HbA wie auch für z.B. HbA₂ benötigt werden, konkurrieren β - und δ -Ketten um sie.

Martinez und Menendez konnten 1983 (71) Messungen durchführen, die eine etwa 7,6 mal größere Affinität zwischen β - und α -Ketten offenbarten, als entsprechend zwischen δ - und α -Ketten.

Diese beiden Gesichtspunkte sind allerdings hauptsächlich hilfreich bei der Erklärung verschieden hoher Konzentrationen einzelner Hämoglobin-Fraktionen und weniger geeignet, den Mechanismus der "An-" und "Abschaltung" der Gene aufzuhellen.

4.3.3 Diskussion der Modelle unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse

Den wichtigsten Beitrag, den die eigenen Ergebnisse zu den Theorien der Gen-Regulation liefern, ist der Aspekt, daß die HbA₂- und HbA-Synthese in der Ontogenese nicht synchron laufen. Diese Feststellung wird auch von anderen Untersuchern gestützt (32). Das bedeutet, daß, wie schon bei dem Methylierungsmodell angedeutet, die Regulation der β - und der δ -Ketten in gewisser Weise unabhängig voneinander läuft.

Damit ist die klonale Theorie weniger wahrscheinlich: HbA₂ gehört offensichtlich, wenn auch nur zu einem geringen Prozentsatz, zum adulten Hämoglobin-Muster, d.h. Zellen mit adultem Programm müßten auch das HbA₂ exprimieren. Wenn das Umschalten in einem Ablösen der Klone fetal programmierter Zellen durch einen Klon adulter besteht, müßten HbA- und HbA₂-Anstieg syn-

chron verlaufen. Ohne zusätzliche Erklärung ist dieses Modell also nicht anwendbar. Das bestätigt Schlüsse, die Betke 1958 (7) aus andersartigen Untersuchungen gezogen hatte. Er lehnte die Hypothese der Ablösung verschiedener, HbF- bzw. HbA-synthesisierender, Zellgenerationen als Erklärung der Umschaltung von HbF zu HbA ab, weil er mit der Methode der sauren Elution in Erythrozyten von Neugeborenen und jungen Säuglingen neben nur HbF- oder nur HbA-enthaltenden Zellen auch solche fand, in denen beide Hämoglobine, in verschiedener Menge, vorhanden waren ("Intermediärzellen").

Während die Vorstellung über den Verlust der DNase-sensitiven Regionen von vorneherein nur das "Abschalten" des γ -Gens betreffen, ist mit verschiedenen Methylierungs-Mustern evtl. auch eine Erklärung für das asynchrone Ansteigen des HbA und HbA₂ gegeben: Beide Struktur-Gene könnten unterschiedlich schnell demethyliert werden, was das "Hinterherhinken" der HbA₂-Entwicklung in der Ontogenese erklären könnte.

Schließlich bleibt noch das Modell der Regulation mittels humoralem Faktor: Hier müßte man annehmen, daß die Gene evtl. unterschiedlich stark beeinflußt werden. Man könnte sich vorstellen, daß das δ -Gen aufgrund seiner Struktur länger braucht, um mit erhöhter Aktivität zu reagieren.

Auch wenn die asynchrone Entwicklung von HbA und HbA₂, die vorgestellten Modelle evtl. kompliziert, darf sie doch nicht außer Acht gelassen werden, um die wirklichen Regulations-Mechanismen aufzudecken.

4.4 DIE MATERNO-FETALE TRANSFUSION ALS STÖRFAKTOR

Die bisherigen Überlegungen und Berechnungen gingen davon aus, daß die Verhältnisse von HbF, HbA und HbA₂ lediglich von der Entwicklung der Feten abhängen. Beträchtliche Fehlbeurteilungen könnten dann eintreten, wenn durch die Plazentaschranke hindurch mütterliches Blut in den Kreislauf des Feten übertritt (sog. materno-fetale Transfusion). Kleine solcher Blutübertritte kommen recht häufig vor, größere materno-fetale Transfusionen sind relativ selten (3.9,59).

Aus den eigenen Untersuchungsergebnissen lassen sich theoretisch die Auswirkungen einer materno-fetalen Transfusion auf die Anteile der einzelnen Hämoglobin-Fraktionen beim Kind berechnen. Ausgegangen wird dabei von den Regressionsgeraden für die Entwicklung von HbA bzw. HbA₂ mit zunehmender SSW (Abb.10 und 11).

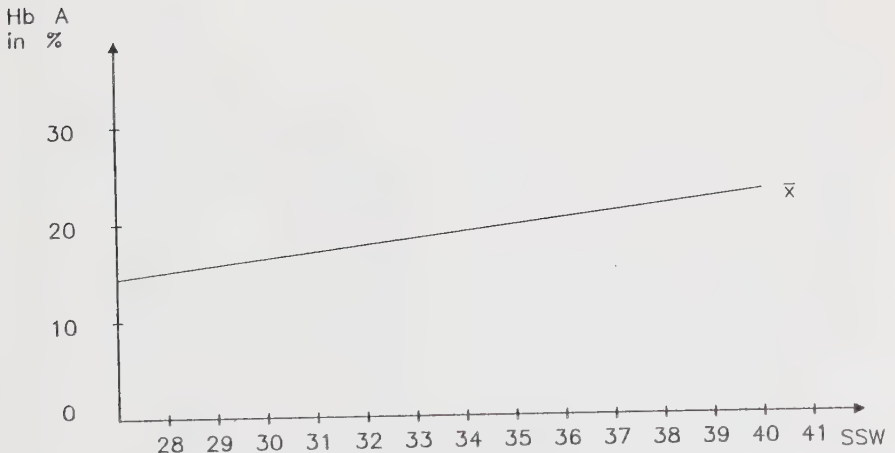


Abb. 10: Prozentualer Anteil von HbA am Blutfarbstoff bei zunehmender SSW

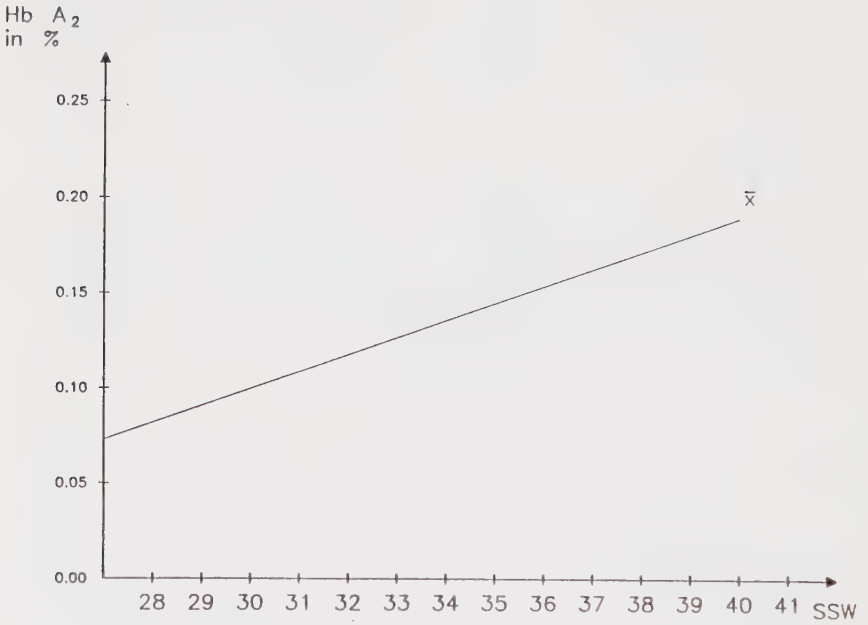


Abb.11: Anteil von HbA₂ am Blutfarbstoff in Prozent bei zunehmender SSW

Anhand der Geradengleichung läßt sich zu jeder SSW ein Mittelwert für die entsprechende Hb-Fraktion berechnen und damit angeben, wieviel % Hb von jeder Fraktion etwa in einer bestimmten SSW vorhanden ist.

Die materno-fetale Transfusion, d.h. das Übertreten von mütterlichem Blut in den kindlichen Kreislauf, soll an dieser Stelle am Beispiel der 34. SSW erörtert werden:

Zu diesem Zeitpunkt hat ein Neugeborenes im Durchschnitt 81% HbF, 0,14% HbA₂ und 19% HbA. Für Erwachsene (also die Mutter) werden folgende Werte angenommen: HbA: 98%, HbA₂: 2%. HbF kann, obwohl es bei Schwangeren durch erhöhte Produktion ansteigt (19, 99), dennoch aufgrund seiner niedrigen Werte vernachlässigt werden. Bei einem Blutübertritt von der Mutter zum Kind steigen demzufolge HbA und HbA₂, während der HbF-Gehalt sinkt.

Tabelle 10 zeigt die berechneten Ergebnisse für fiktive materno-fetale Transfusionen, die 0% bis 60% des im Kind kreisenden Blutes ausmachen:

Transfusion (% mütterliches Blut im kindlichen Kreislauf)	HbA ₂	HbA	HbF
0 %	0,14 %	19 %	81 %
10 %	0,33 %	27 %	73 %
20 %	0,51 %	35 %	65 %
30 %	0,70 %	43 %	57 %
40 %	0,88 %	51 %	49 %
50 %	1,07 %	59 %	41 %
60 %	1,26 %	68 %	32 %

Tab. 10: Materno-fetale Transfusion, Auswirkung auf die im Kind gefundenen Hb-Fraktionen.

Um einen Vergleich zu haben, wurden diese Ergebnisse in Koordinatensysteme eingezeichnet, in denen Referenz- bzw. Normbereiche dargestellt sind. Als solche werden alle Werte angenommen, die innerhalb der doppelten Standardabweichung ($2\bar{s}$) um den Mittelwert ($\bar{x}$) liegen. Das entspricht bei einer angenommenen normalverteilten Kurve 95,5%.

In Abb. 12 ist die Entwicklung von HbA_2 in Abhängigkeit von der SSW dargestellt. Der auf der Regressionsgeraden eingezeichnete Wert für HbA_2 in der 34. SSW entspricht dem angenommenen Normalwert, die Markierungen darüber kennzeichnen dann die HbA_2 -Anteile bei 10% bzw. 20% mütterlichem Blut.

Analog dazu wurde bei der Darstellung der HbA -Anteile in Abhängigkeit zur SSW verfahren. Auch hier wieder der Normalwert auf der Regressionsgeraden, sowie zwei Beispiele für Transfusionen (Abb. 13).

Als letzte Darstellung wurde ein Koordinatensystem gewählt, das HbA_2 in Abhängigkeit von HbA darstellt (Abb. 14). Der Normbereich wurde wieder entsprechend den beiden vorangegangenen Graphiken markiert.

Wie in Kapitel 3.4 schon erwähnt, muß angenommen werden, daß das Verhältnis der beiden Fraktionen zueinander mit steigendem Alter zugunsten von HbA_2 verschoben wird. Daraus kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß bei materno-fetalen Transfusionen größeren Ausmaßes auch dieses Verhältnis in charakteristischerweise, d.h. in Richtung einer "Erwachsenen-Konstellation", beeinflusst wird. Die eingezeichneten Werte für 10%, 20% und 30% bestätigen diese Vermutung.

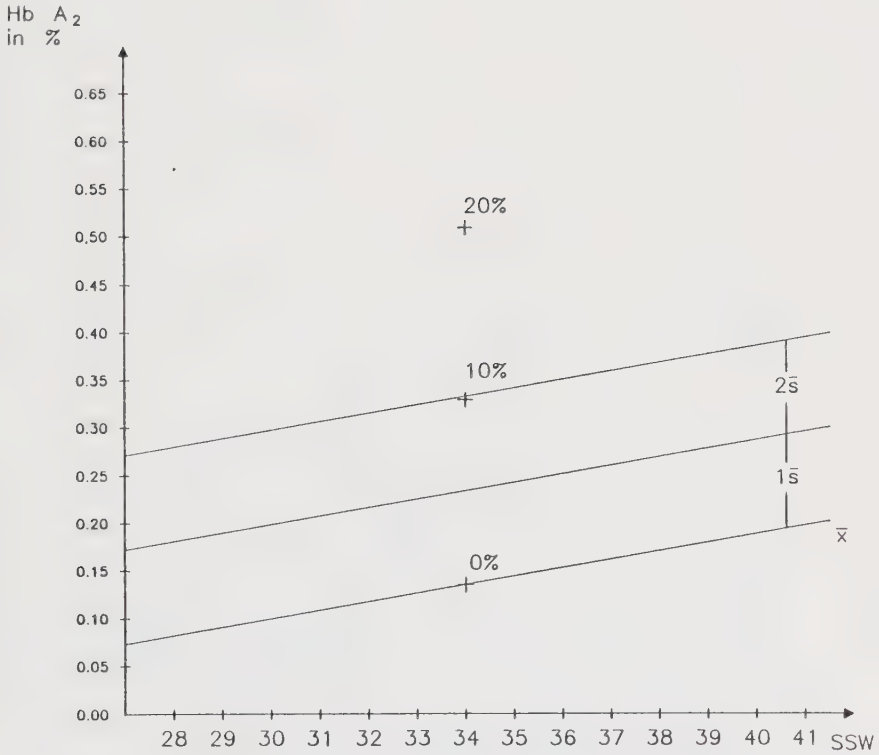


Abb. 12: Entwicklung des Anteils an HbA₂ in Abhängigkeit von der SSW: Normalbereich und Beispiele materno-fetaler Transfusionen.

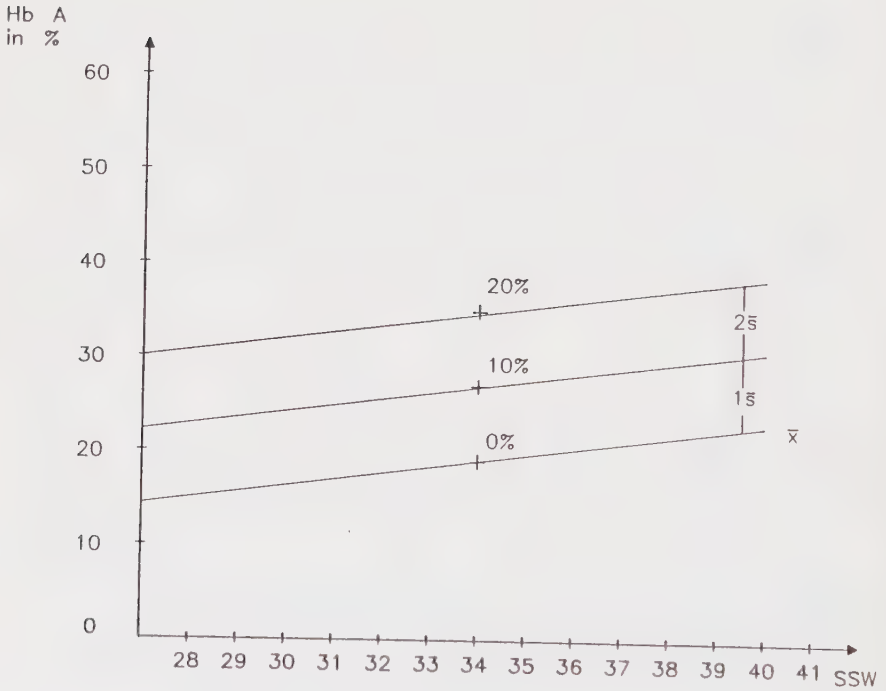


Abb. 13: Entwicklung des Anteils an HbA in Abhängigkeit von der SSW: Normalbereich und Beispiele materno-fetaler Transfusionen.

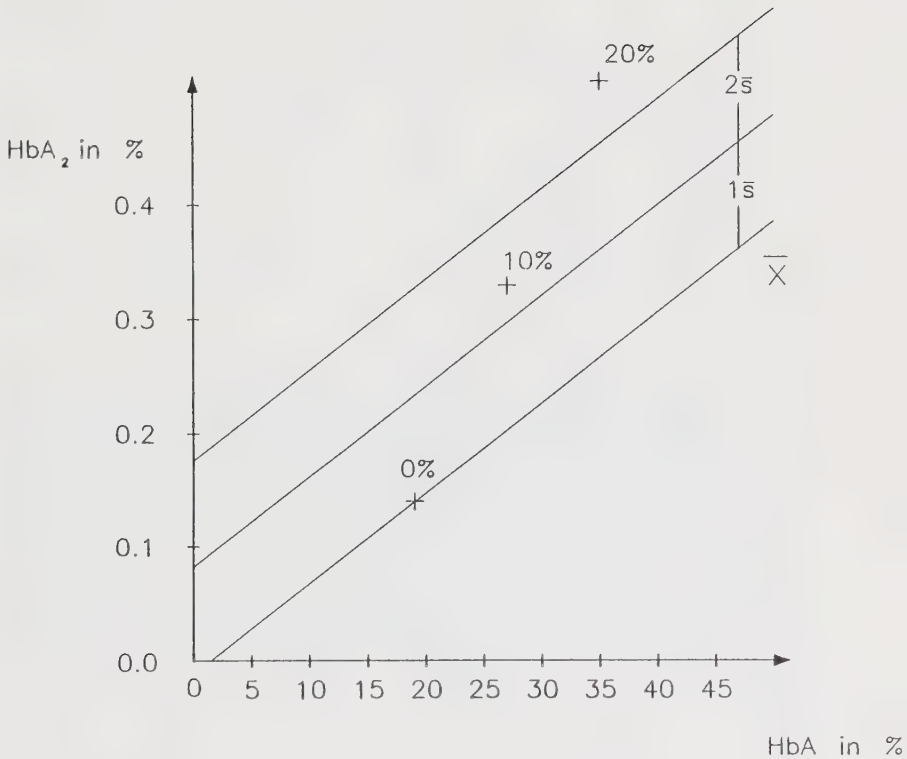


Abb. 14: Entwicklung des Anteils von HbA₂ in Abhängigkeit von der des HbA: Normalbereich und Beispiele materno-fetaler Transfusionen.

Anhand der drei Graphiken ist folgendes gut zu erkennen: Während bei einer Menge von 10% mütterlichem im kindlichen Blut die Anteile der Hb-Fraktionen, zumindest in Abbildung 13 und 14, noch im Normbereich liegen, fallen sie ab spätestens 20% heraus und werden damit verdächtig auf eine stattgehabte materno-fetale Transfusion. Dabei ist zudem zu berücksichtigen, daß der "Normbereich" aus allen Meßwerten konstruiert wurde, ohne Überprüfung, ob ein Blutübertritt von der Mutter vorlag oder nicht. Es ist daher möglich, daß sich auch unter diesen "Normwerten" Fälle mit Blutübertritten befanden, die die Standardabweichung nicht der Realität entsprechend vergrößern. Damit wäre der Normbereich zu weit gefaßt. Die angegebenen Grenzwerte stellen aus diesem Grund relativ sichere Kriterien dar. In jedem Fall sind nur relativ große Blutübertritte auf diese Weise faßbar. Die Aussagekraft ist nicht größer als man sie mit der Bestimmung von IgM im Blut von Neugeborenen erreicht (79). Das kann dennoch nützlich sein, um eine pathologische Polyglobulie bei einem Neugeborenen zu erklären.

Die viel häufigeren geringen materno-fetalen Blutübertritte sind nur zu sichern, wenn man es den einzelnen Erythrozyten ansehen kann, ob sie von der Mutter stammen. Das ist dann möglich, wenn zwischen Mutter und Kind bestimmte Blutgruppenunterschiede vorliegen (23,33). Eine andere Möglichkeit, die generell anwendbar ist, besteht in der Sichtbarmachung von HbA₂ in den Erythrozyten durch fluoreszierende Antikörper. Aufgrund der noch recht geringen Bildung von HbA₂ im Fetalalter, die durch die eigenen Untersuchungen quantitativ erfaßt wurden, können bei dieser Methode hell leuchtende Erythrozyten als von der Mutter stammend angesprochen werden (3,11,45).

Das Problem der materno-fetalen Transfusion stellte sich bei der Auswertung der Ergebnisse von drei Kindern der 26. SSW, die außer den für die Statistik ausgewerteten Kindern der 28. - 41. SSW untersucht wurden.

Sie zeigten, wie auch schon in Kapitel 3.5 aufgeführt, folgende Meßwerte:

	Gewicht	Petrussa	HbF	HbA	HbA ₂
1.	840 g	26	99,4%	0,5%	0,08%
2.	995 g	-	67,4%	32,0%	0,62%
3.	990 g	26	79,5%	20,1%	0,36%

Nach den für den Beweis einer materno-fetalen Transfusion errechneten Kriterien dürfte es sich in den Fällen 2 und 3, die deutlich aus dem allgemeinen Trend herausfallen, um solche Ereignisse handeln.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Bei 73 Neu- bzw. Frühgeborenen, sowie bei 11 Erwachsenen wurden die prozentualen Anteile an HbA_2 , HbA und HbF im Blutfarbstoff untersucht.

HbA_2 wurde nach einer von Efremov et al. (29) beschriebenen, von mir modifizierten DEAE-Säulenchromatographie-Methode bestimmt, HbF mit Hilfe der Alkali-Denaturierung, woraus dann auch der HbA -Gehalt resultierte.

Die so gemessenen Hämoglobin-Fractionen der Neugeborenen wurden zu den Parametern SSW, Reife nach Petrusa und Geburtsgewicht in Beziehung gesetzt und damit ihre Änderung von der 28. bis 41. SSW ermittelt.

HbA_2 als für diese Untersuchungen wichtigste Fraktion konnte mit Werten zwischen 0,0 und 0,4% bereits auch bei den jüngsten Kindern nachgewiesen werden; Neugeborene ab der 38. SSW hatten im Mittel 0,19% HbA_2 .

HbF zeigte den bekannten Abfall. Reife Kinder hatten im Mittel einen HbF -Anteil von 76%.

Statistisch belegbar waren die Korrelationen zwischen den Hämoglobin-Fractionen: Je höher HbA_2 war, desto höher war auch HbA und desto tiefer HbF .

Bei der Gegenüberstellung der Entwicklung von HbA_2 und HbA zeigte sich jedoch, daß die erstere etwas verzögert verlief, der HbA -Entwicklung also sozusagen hinterherhinkte. Objektivierbar war das am Absinken des Quotienten $\text{HbA} / \text{HbA}_2$ von 1 : 237 auf 1 : 129 im Laufe der letzten fetalen Entwicklung.

Das Verhältnis HbA / HbF zeigte selbstverständlich zunehmende Tendenz.

Diskutiert werden die eigenen Ergebnisse im Hinblick auf die Regulation der Gen-Expression. Das wichtigste eigene Ergebnis in diesem Zusammenhang war das Nachziehen der HbA_2 -Entwicklung, im Vergleich zur HbA -Entwicklung, das in der entsprechenden Gen-Regulation sein Korrelat haben muß.

Die Korrelation der gemessenen Werte der Hb-Fractionen zum Ent-

wicklungsstand wird gestört, wenn ein transplazentarer Blutübertritt von der Mutter in das Kind, eine sogenannte materno-fetale Transfusion erfolgt ist. Es wurde daher durchgerechnet, welche Veränderungen in einem solchen Fall im Blut des Kindes zu erwarten sind. Meßergebnisse von zwei Kindern der 26. SSW zeigten die Wahrscheinlichkeit einer solchen materno-fetalen Transfusion. Anhand der Zusammensetzung der Hb-Fraktionen lassen sich jedoch nur große materno-fetale Transfusionen sichern; für den Nachweis der vermutlich viel häufigeren kleinen materno-fetalen Blutübertritte braucht man Methoden, die sie cytologisch erfassen.

6. A N H A N G : T A B E L L E N

Tabelle I: Eichmessungen zur Hämoglobin-Messung

Nr.	Standard Hb (*)	Transformations- Lösung	= g% Hb	E (+)	Hb mit E errechnet
1	2,50 ml	0,00 ml	18,0 g%	0,485	17,85 g%
2	2,75 ml	0,25 ml	16,5 g%	0,445	16,38 g%
3	2,50 ml	0,50 ml	15,0 g%	0,405	14,90 g%
4	4,50 ml	1,50 ml	13,5 g%	0,362	13,32 g%
5	2,00 ml	1,00 ml	12,0 g%	0,322	11,85 g%
6	3,50 ml	2,50 ml	10,5 g%	0,281	10,34 g%
7	1,50 ml	1,50 ml	9,0 g%	0,243	8,94 g%
8	2,50 ml	3,50 ml	7,5 g%	0,202	7,43 g%
9	1,00 ml	2,00 ml	6,0 g%	0,168	6,18 g%
10	1,50 ml	4,50 ml	4,5 g%	0,120	4,42 g%
11	0,50 ml	2,50 ml	3,0 g%	0,085	3,13 g%
12	0,25 ml	5,75 ml	0,75g%	0,0205	0,754g%

(*): Standard-Hämoglobin-Lösung von Sigma chemical company: 5,0 ml = 36,0 g% Hb

(+): Extinktion am Photometer

Tabelle II: Maße und Hämoglobin-Werte der Neu- bzw. Frühgeborenen
(m.: männlich, w.: weiblich, Geb.-Gew.: Geburtsgewicht)

Nr.	Geschlecht	Geb.-Gew.	Größe	SSW	Petrussa	HbF %	HbA %	HbA ₂ %
01	w.	3130 g	50 cm	40	40	72,5	27,3	0,16
02	m.	3200 g	50 cm	39	-	70,2	29,7	0,15
03	m.	3450 g	54 cm	40	39	80,5	19,3	0,17
04	w.	2970 g	48 cm	39	-	86,3	13,6	0,11
05	m.	3790 g	54 cm	39	40	74,5	25,2	0,28
06	m.	4150 g	53 cm	41	40	68,2	31,4	0,37
07	m.	3530 g	50 cm	39	-	71,2	28,6	0,19
08	m.	3010 g	49 cm	38	39	80,5	19,4	0,14
09	m.	3330 g	50 cm	38	38	79,5	20,3	0,18
10	m.	4110 g	55 cm	40	40	73,6	26,1	0,28
11	w.	3400 g	53 cm	39	40	66,9	32,7	0,41
12	w.	3940 g	54 cm	39	40	66,4	33,2	0,38
13	m.	3480 g	52 cm	39	-	81,1	18,8	0,12
14	m.	3380 g	51 cm	41	40	83,5	16,4	0,08
15	w.	3110 g	50 cm	39	39	69,5	30,2	0,30
16	w.	3970 g	54 cm	41	40	68,9	30,9	0,23
17	m.	4160 g	55 cm	41	-	77,7	22,2	0,13
18	m.	4100 g	54 cm	41	40	91,3	08,6	0,10

Tabelle II: Fortsetzung

Nr.	Geschlecht	Geb.-Gew.	Größe	SSW	Petrussa	HbF %	HbA %	HbA ₂ %
19	w.	3850 g	-	-	-	85,6	14,3	0,13
20	m.	4300 g	-	-	-	89,6	10,3	0,06
21	m.	3200 g	51 cm	38	38	91,1	08,9	0,00
22	w.	3020 g	49 cm	40	-	83,3	16,6	0,15
23	w.	2950 g	48 cm	40	35	84,2	15,6	0,22
24	m.	1760 g	41 cm	30	-	86,4	13,6	0,02
25	m.	2600 g	49 cm	36	36	85,9	14,0	0,08
26	m.	2250 g	45 cm	-	36	85,8	14,1	0,08
27	w.	2580 g	51 cm	37	-	84,2	15,7	0,14
28	w.	2650 g	-	36	-	81,8	18,8	0,08
29	m.	3210 g	53 cm	-	37	82,6	17,3	0,14
30	m.	2430 g	50 cm	36	36	89,1	10,8	0,12
31	w.	0840 g	33 cm	26	26	99,4	00,5	0,08
32	m.	1300 g	39 cm	30	29	78,5	21,4	0,08
33	w.	1710 g	-	-	34	92,3	07,5	0,17
34	m.	2570 g	47 cm	36	35	90,7	09,2	0,12
35	w.	-	-	29	-	89,5	10,3	0,16
36	w.	-	-	-	31	91,2	08,7	0,10

Tabelle II: Fortsetzung

Nr.	Geschlecht	Geb.-Gew.	Größe	SSW	Petrusaa	HbF %	HbA %	HbA ₂ %
37	w.	2080 g	47 cm	-	35	88,7	11,2	0,08
38	m.	2340 g	47 cm	35	35	72,7	27,2	0,10
39	m.	3520 g	51 cm	38	38	76,5	23,4	0,12
40	m.	2620 g	45 cm	-	37	64,1	35,8	0,13
41	w.	2160 g	44 cm	33	32	82,1	17,8	0,11
42	w.	2370 g	48 cm	35	35	77,7	22,1	0,16
43	w.	2570 g	46 cm	36	35	67,9	31,9	0,19
44	w.	1740 g	44 cm	32	33	82,6	17,3	0,11
45	w.	2490 g	46 cm	41	36	72,5	27,4	0,13
46	m.	2490 g	-	28	-	83,1	16,9	0,04
47	w.	1105 g	33 cm	28	-	81,2	18,7	0,09
48	w.	-	-	-	31	69,6	30,3	0,15
49	w.	1650 g	42 cm	33	-	85,6	14,3	0,06
50	w.	2200 g	45 cm	36	-	83,7	16,3	0,05
51	w.	2540 g	47 cm	34	-	60,5	39,2	0,26
52	m.	1900 g	42 cm	33	-	89,2	10,7	0,06
53	m.	1490 g	-	31	31	90,4	09,6	0,05
54	m.	0950 g	37	28	-	92,7	07,3	0,05

Tabelle II: Fortsetzung

Nr.	Geschlecht	Geb.-Gew.	Größe	SSW	Petrussa	HbF %	HbA %	HbA ₂ %
55	-	-	-	-	-	85,7	14,3	0,05
56	w.	2200 g	-	32	-	85,8	14,1	0,14
57	w.	2360 g	47 cm	38	-	87,1	12,8	0,13
58	m.	1810 g	45 cm	35	-	80,7	19,2	0,11
59	m.	1650 g	45 cm	35	-	82,7	17,2	0,08
60	m.	1780 g	46 cm	31	-	88,0	11,9	0,10
61	m.	1620 g	42 cm	32	-	84,4	15,5	0,09
62	m.	2035 g	45 cm	34	-	78,3	21,6	0,15
63	m.	2000 g	43 cm	32	-	86,4	13,6	0,00
64	w.	2400 g	49 cm	34	-	70,5	29,3	0,18
65	m.	0994 g	36 cm	26	-	67,4	32,0	0,62
66	w.	1160 g	37 cm	32	32	85,3	14,6	0,06
67	w.	2220 g	45 cm	35	35	61,6	38,1	0,28
68	m.	0990 g	-	26	26	79,5	20,1	0,36
69	w.	2000 g	47 cm	33	-	77,7	22,0	0,35
70	w.	2270 g	49 cm	35	-	72,2	27,5	0,35
71	w.	1625 g	44 cm	31	31	83,0	16,9	0,12
72	m.	1700 g	41 cm	33	33	70,4	29,3	0,33
73	m.	1570 g	45 cm	30	30	78,9	21,8	0,16

Tabelle III: Werte der Erwachsenen-Vergleichspopulation

Nr.	HbA %	HbA ₂ %	HbF
01	98,38	1,6	0,34
02	98,16	1,8	0,22
03	98,21	1,8	0,23
04	98,25	1,8	0,23
05	98,59	1,4	0,37
06	98,53	1,5	0,00
07	98,54	1,5	0,04
08	98,45	1,6	0,10
09	98,31	1,7	0,11
10	97,41	2,5	0,22

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ACKERKNECHT, E.H.:

Geschichte der Medizin

Enke Verlag, S. 145, 4. Auflage, 1979

2. ALTER, B.P., CAMPBELL, A.S.:

Increased synthesis of mouse minor hemoglobin erythroid colonies:

A cellular model for hemoglobin regulation

Exp. Hematol., Sup. 12 (8) 611-616 1984

3. ASMUS, H.:

Der Nachweis materno-fetaler Transfusion mit Hilfe fluoreszierender Anti-HbA₂-Antikörper

Dissertationsarbeit, 1974

4. BAGLIONI, C., INGRAM, V.M., SULLIVAN, E.:

Genetic Control of Foetal and Adult Human Haemoglobin Nature, (Lond.), 189 467 1961

5. BARD, H.:

Postnatal fetal and adult hemoglobin synthesis in early pre-term newborn infants

J. of Clin. Invest., 52 1789-1795 1973

6. BARD, H., MAKOWSKI, G.L., MESCHIA, G., BATTAGLIA, F.C.:

The relative rates of synthesis of hemoglobins A and F in immature red cells of newborn infants.

Pediatrics, 45 766-772 1970

7. BETKE, K.:

Hämatologie der ersten Lebenszeit, in: Ergebnisse der Inneren Medizin

Bd. 9, S. 437 1958

8. BETKE, K.:

Das Hämoglobin und die Hämoglobinanomalien
In: Handbuch der Inneren Medizin
Bd. II, S. 636, Springer Verlag 1968

9. BETKE, K.:

Materno fetal transfusion its incidence and clinical significance.
XIV th Internat. Congr. Hemat. Sao Paulo 1972

10. BETKE, K., MARTI, H.R., SCHLICHT, I.:

Estimation of small percentages of foetal haemoglobin
Nature, (Lond.), 184 1877-1878 1959

11. BETKE, K., SANGUANSEMSRI, TH.:

Zytologische Blutfarbstoffdifferenzierung
(Möglichkeiten, Ergebnisse und Nutzenanwendungen)
Münchner Med. Wochenschrift 114. Jahrgang 1972
Nr. 23, S. 1099-1104

12. BETKE, K., SAVELSBERG, W.:

Stufenphotometrische Hämoglobin Bestimmung mittels
Cyanhämoglobin
Biochem. Z. 320 431 1950

13. BISCHOFF, H.:

Untersuchungen über die Resistenz des Hämoglobins
des Menschenblutes mit besonderer Berücksichtigung
des Säuglingsalters
Zeitschr. f. Gesamte Experim. Med., 48 472-489
1925

14. BOYER, S.H., MARGALET, L., BOYER, M.L., HUISMAN, T.H.,
SCHROEDER, W.A., WOOD, W.G., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B.,
CARTNER, R.:
Inheritance of F cell frequency in heterocellular
hereditary persistence of fetal hemoglobin: An
example of allele exclusion
Am. J. Gen., 29 256 1977
15. BRAUNITZER, G., GEHRING-MÜLLER, R., HILSCHMANN, N., HILSE, K.,
HOBOM, G., RUDLOFF, V., WITTMANN-LIEBOLD, B.:
Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobins
Z. Physiol. Chem. 325 283 1961
16. BRAUNITZER, G., HILSE, K., RUDLOFF, V., HILSCHMANN, N.:
The hemoglobins
Adv. Protein Chem., 19 1 1964
17. BRAUNITZER, G., LIEBOLD, B., MÜLLER, R., RUDLOFF, V.:
The homologous chemical structure of peptide chains
in human hemoglobin A
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 320 170-172 1960
18. BRAUNITZER, G., RUDLOFF, V., HILSCHMANN, N., HILSE, K.,
LIEBOLD, B., MÜLLER, R.:
A partial formula for the α -chain of the main com-
ponent of adult human hemoglobin
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 320 283-288 1960
19. BROMBERG, Y.M., SALZBERGER, M., ABRAHAMOV, A.:
Alkali Resistent Type of Hemoglobin Women with Molar
Pregnancy
Blood 12 1122 1957

20. BUSSLINGER, M., FLAVELL, R.A.:
DNA-Methylation and the Regulation of Globin Gene
Expression
Progr. Clin. Biol. Res., 134 139-203 1983
21. BUSSLINGER, M., HURST, J., FLAVELL, R.A.:
DNA-Methylation and the Regulation of Globin Gene
Expression
Cell, 34 197-206 1983
22. CHERNOFF, A.I.:
Immunologic studies of hemoglobins
Quantitative precipitin test using anti-fetal hemo-
globin sera
Blood, 8 413-421 1953
23. COHEN, F., ZUELZER, W.W.:
The transplacental passage of maternal erythrocytes
into the fetus
Amer. J. Obst. & Gynec., 15 566-569 1965
24. DEISSEROTH, A., NIENHUIS, A., LAWRENCE, J., GILES, R.,
TURNER, P., RUDDLE, F.H.:
Chromosomal localization of human beta-globin gene
on human chromosome 11 in somatic cell hybrids
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75 1456-1460 1978
25. DEISSEROTH, A., NIENHUIS, A., TURNER, P., VELEZ, R.,
ANDERSON, W.F., RUDDLE, F., LAWRENCE, J., CREAGAN, R.,
HUCKERLAPATI, R.:
Localization of the human alpha-globin structural
gene to the chromosome 16 in somatic cell hybrids
by molecular hybridization assay
Cell, 12 205-218 1977

26. DEISSEROTH, A., VELEZ, R., NIENHUIS, A.W.:
Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids:
independent segregation of the human alpha and
beta-globin genes
Sciences, 191 1262-1264 1976
27. DE SIMONE, J. HELLER, P., AMSEL, J., USMAN, M.:
Magnitude of the fetal hemoglobin response to
acute hemolytic anemia in baboons controlled by
genetic factors
J. Clin. Invest., 65 224-226 1980
28. DOVER, G.J., CHAN, TH., SIEBER, F.:
Fetal Hemoglobin Production in Cultures of Primi-
tive and Mature Human Erythroid Progenitors:
Differentiation Affects the Quantity of Fetal Hemo-
globin Produced per Fetal-Hemoglobin-Containing Cell
Blood, 61 1242-1246 1983
29. EFREMOV, G.D., HUISMAN, T.H.J., BOWMAN, K., WRIGHTSTONE, R.N.,
SCHROEDER, W.A.:
Microchromatography of haemoglobins
II. A rapid method for the determination of HbA,
J. of Lab. and Clin. Med., 83 657-664 1974
30. EFSTRATIADIS, A., POSAKONY, J.W., MANIATIS, T., LAWN, M.,
O'CONNELL, C., SPRITZ, R.A., DE RIEL, J.K., FORGET, B.G.,
WEISSMAN, S.M., SLIGHTON, J.L., BLECHL, A.E., SMITHIES, O.,
BARALLE, F.E., SHOULDERS, C.C., PROUDFOOT, N.J.:
The structure and evolution of the human β -globin
gene family
Cell, 21 653-668 1980

31. ERDEM, S., AKSOY, M.:
The increase of hemoglobin A₂ to its adult level
Israeli J. of Med. Science, 5 427 1969
32. FELICETTI, L., NOVELLETTA, A., BENINCASA, A., TERRENATO, L.,
COLOMBO, B.:
The HbA / HbA₂ ratio in newborns and its correlation
with fetal maturity
Br. J. of Haematol., 56 465-471 1984
33. FISCHER, K.:
Zum Nachweis mütterlicher Erythrozyten im Neugebo-
renenblut
Mschr. Kinderheilkunde, 115 147 1967
34. FLAVELL, R.A., HOOTER, J.M., DE BOER, E., LITTLE, P.F.R.,
WILLIAMSON, R.:
Analysis of the β - δ -gene loci in normal and Hb Le-
pore DNA: direct determination of gene linkage and
intergene distance
Cell, 15 25-41 1978
35. FRITSCH, E.F., LAWN, R.M., MANIATIS, T.:
Molecular cloning and Characterization of the Human
 β -like Gene Cluster
Cell, 19 959-972 1980
36. GHEE MC, J.D., RAU, D.C., FELSENFELD, G.:
Chromatin Structure of the Chicken Adult β -Globin
Gene: Is Gene Activity Associated with Local or
Long-Range Perturbations in Chromatin-Structure?
Progr. Clin. Biol. Res., 134 143-157 1983

37. GROUDINE, M., EISENMANN, R., GELINAS, R., WEINTRAUB, H.:
Developmental Aspects of Chromatin Structure and
Gene Expression
Progr. Clin. Biol. Res., 134 159-182 1983
38. GROUDINE, M., KOHWI-SHIGEMATSU, T., GELINAS, R., STAMATO-
YANNOPOULOS, G., PAPAYANNOPOULOU, TH.:
Human fetal to adult hemoglobin switching:
Changes in chromatin structure of the β -globin gene
locus
Progr. Clin. Biol. Res., 80 7551-7555 1983
39. HELLER, P., YAKULIS, V.:
The Distribution of Hemoglobin A,
Ann. N.Y. Acad. Sci., 165 54 1969
40. HILL, R.J., KONIGSBERG, W., GUIDOTTI, G., CRAIG, L.C.:
The structure of human hemoglobin
I. The separation of the α - and β -chains and their
amino acid composition
J. Biol. Chem., 237 1549 1962
41. HILL, P., KRAUS, A.P.:
Studies on the amino acid sequence of HbA,
Fed. Proc., 22 597 1963
42. HÖRLEIN, H., WEBER, G.:
Chronisch familiäre Methämoglobinämie und eine neue
Modifikation des Methämoglobins
Dt. med. Wochenschrift, 73 476 1948
43. HOLLENBERG, M.D., HABACK, M.M., KAZAZIAN, H.H.JR.:
Adult hemoglobin synthesis by reticulocytes from
the human fetus at midtrimester
Science, 174 698-702 1971

44. HORTON, B.F., THOMPSON, R.B., DOZY, A.M., NECHTMAN, C.M.,
NICHOLS, E., HUISMAN, T.H.J.:
Inhomogeneity of Hemoglobin
VI. Minor Hemoglobin Components of Cord Blood
Blood, 20 No.3 302-313 1962
45. HOSOI, T.:
Fluorescent antibody technique utilized for studies
on cellular distribution of erythrocytic antigens
Acta haematol. Jap., 31 138 1968
46. HUEHNS, E.R., SHOOTER, E.M.:
Human haemoglobins
J. Med. Gen., 2 48-90 1965
47. HUISMAN, T.H.J.:
Normal and abnormal human hemoglobins
Advanc. Clin. Chem., 6 231 1963
48. HUISMAN, T.H.J., MARTIS, E.A., DOZY, A.:
Chromatography of hemoglobin types on carboxymethyl-
cellulose
J. Lab. Clin. Med., 52 312-327 1958
49. HUISMAN, T.H.J., MEYERING, C.A.:
Studies on the heterogeneity of hemoglobin
I. The heterogeneity of different human hemoglobin
types in carboxy methyl cellulose and in amber-
lite IRC-50-chromatography: qualitative aspects
Clin. Chim. Acta, 5 103-123 1960
50. INGRAM, V.M.:
Gene Evolution and Haemoglobins
Nature, (Lond.), 199 1079-1084 1961

51. INGRAM, V.M., STRETTON, A.O.W.:
Human haemoglobin A₂: chemistry, genetics and evolution
Nature (Lond.), 199 1079-1084 1961
52. INGRAM, V.M., STRETTON, A.O.W.:
Human haemoglobin A₂
II. The chemistry of some peptides peculiar to haemoglobin A₂
Biochim. Biophys. Acta (Amsterd.), 62 456 1962
53. IOLASCON, A., PINTO, L., NOBILI, B., CUTILLO, S.:
Developmental changes in HbA₂ and HbF on Neocytes and Gerocytes in Normal Infants during the First Year of Life
Acta haemat., 70 278-279 1983
54. JOSEPHSON, A.M., MASRI, M.S., SINGER, L., DWORKIN, D.,
SINGER, K.:
Starch Block Electrophoretic Studies of Human Hemoglobin Solutions
II. Results in Cord Blood, Thalassemia and other Hematologic Disorders: Comparison with Tiselius Electrophoresis
Blood, 13 543 1958
55. KALTSOYA, A., FESSAS, P., STAVROPOULOS, A.:
Hemoglobins of early human embryonic development
Science, 153 1417-1418 1966
56. KAZAZIAN, H.H.JR., WOODHEAD, A.P.:
Hemoglobin A synthesis in the developing fetus
N. Engl. J. Med., 289 58-62 1973

57. KLEIHAUER, E.:
In: Stave, U., ed.: Physiology of the perinatal
period: functional and biochemical development in
mammals
Vol. 1, 255-297 1970
58. KLEIHAUER, E. (Hrsg.):
Hämatologie, Springer Verlag, Berl., Heidelb., N.Y.
1978
59. KLEIHAUER, E., HÖTZEL, U., BETKE, K.:
Die materno-fetale Transfusion
Monatsschrift für Kinderheilkunde, Bd. 115, Heft 4
S. 145-146 1967
60. KÖRBER, E.:
Über Differenzen des Blutfarbstoffes
Inaugural Dissertation, Dorpat 1866
Zbl. Med. Wiss., 5 177 1867
61. KOHNE, E.:
Thalassämie Syndrome und anomale Hämoglobine in
Deutschland
Habilitationsschrift, Ulm 1976
62. KOHNE, E., KLEIHAUER, E.:
Free alpha chains in adult and cord blood haemosy-
sates
Res. exp. Med., 161 243 1973
63. KONIGSBERG, W., HILL, R.J.:
The structure of human hemoglobin
III.: The sequence of amino acids in the tryptic
peptides of α -chain
J. biol. Chem., 237 2547 1962

64. KUNKEL, H.G., WALLENIS, G.:
New hemoglobin in normal adult blood
Science, 122 288 1955
65. LANG, A., LORKIN, P.A.:
Genetics of Human Haemoglobins
Br. Med. Bull., 32 239 1976
66. LAWN, R.M., FRITSCH, G.F., PORKER, R.C., BLAKE, G.
MANIATIS, T.:
The isolation and characterization of linked
 δ - and β -globin genes from a cloned library
of human DNA
Cell, 15 1157-1174 1978
67. LEHMANN, H., CARRELL, R.W.:
Differences between α - and β -chain mutants of hu-
man hemoglobin and between α - and β -thalassaemia
Possible Duplication of the α -chain gene
Brit. Med. J., 4 748-750 1968
68. LEHMANN, H., HUNTSMAN, R.G.:
Man's Haemoglobins
North Holland publ. Company, Amsterdam, Oxford 1974
69. LEY, T.J., DE SIMONE, J., ANAGNOU, N.P., KELLER, G.H.,
HUMPHRIES, R.K., TURNER, P.H., YOUNG, N.S., KELLER, P.,
NIENHUIS, A.W.:
5-Azacytidine Selectively Increases γ -Globin Syn-
thesis In Patient With β^+ Thalassemia
New Engl. J. Med., 307 1469 1982

70. LÖFFELER, G., PETRIDES, P.E., HARPER, L.W.A.H.:
Physiologische Chemie
Springer Verlag, Berl., Heidelb., N.Y.
S. 116 1979
71. MARTINEZ, G., MENENDEZ, R.:
Differences in Affinity of β and δ Hemoglobin
chains for α -chains
A possible Explanation for the Variation in the
Percentages of Hemoglobin A₂ in Thalassaemia and
other disorders
Biochimica and Biophysica Acta, 743 256-259
1983, Elsevier Biomedical Press
72. MASERA, G.:
Diagnosi di eterozigotismo per la β -talassemia nel
primo anno di vita
Minerva Pediatrica, 20 686 1968
73. MASON, K.P., GRANDISON, Y., HAYES, R.J., SERJEANT, B.E.,
SERJEANT, G.R., VAIDYA, S., WOOD, W.G.:
Postnatal decline of fetal haemoglobin in homozy-
gous sickle cell disease: relationship to paren-
tal HbF levels
Br. J. of Haematol., 52 455-463 1982
74. MAVILIO, L., GIAMPAOLO, A., CARE, A., MIGLIACCIO, G.,
CALANDRINI, M., RUSSO, G., PAGLIADI, G.L., MASTROBERARDINO, G.,
MARINUCCI, M., PESCHLE, C.:
Molecular mechanisms of human hemoglobin switching:
Selective undermethylation and expression of globin
genes in embryonic, fetal and adult erythroblasts
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 6907-6911 1983

75. MEARS, J.G., RAMIREZ, F. LEIBOWITZ, D., BANK, A.:
Organization of human δ - and β -globin genes in
cellular DNA and the presence of intergenic inserts
Cell, 15 15-23 1978
76. MUIRHEAD, H., PERUTZ, M.F.:
Structure of haemoglobin: A three dimensional Fourier
synthesis of reduced human haemoglobin at 5.5 Å
resolution
Nature (Lond.), 199 633 1963
77. MULLER, C.J.:
Molecular Evolution
Van Gorcum, Assen, S.46 1961
78. MULLER, C.J., JONXIS, J.H.P.:
Identity of haemoglobin A₂
Nature (Lond.), 188 949-950 1960
79. MURALT V., G.:
Maternofetale Blutung und "Respiratory Distress
Syndrom"
Pädiatr. Fortbildg. 21 90 1967
80. NATHAN, D.G.:
Regulation of Erythropoiesis and Hemoglobin F Pro-
duction
Progr. Clin. Biol. Res., 134 365-378 1983
81. NIENHUIS, A.W., BENZ, E.J.:
Regulation of Hemoglobin Synthesis During the De-
velopment of the Red Cell
New Engl. J. of Medicine, 297 No. 24 1977

82. OLD, J., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., HOLENGHI, S., COMI, P.
GIGLIONI, B., MITCHELL, J., TOLSTOSHEV, P., WILLIAMSON, R.:
A direct estimation of the number of human γ -globin
genes
Cell, 8 13-18 1976
83. OSKI, F.A., NAIMANN, J.L.:
Hematologic Problems in the Newborn
2nd ed. Philadelphia, Saunders 1972
84. PAPAYANNOPOULOU, TH., BRICE, M., STAMATOYANNOPOULOS, G.:
Hemoglobin F synthesis in vitro: Evidence for con-
trol at the level of primitive erythroid stem cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 No. 7 2923-2927 1977
85. PAPAYANNOPOULOU, TH., KURACHI, S., NAKAMOTO, B., ZANJANI, E.D.
STAMATOYANNOPOULOS, G.:
Hemoglobin switching in culture: Evidence for a hu-
moral factor that induces switching in adult and
neonatal but not fetal erythroid cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 6579-6583 1982
86. PAPAYANNOPOULOU, TH., SHEPHARD, TH., STAMATOYANNOPOULOS, G.:
Studies of Hemoglobin Expression in Erythroid Cells
of Early Human Fetuses Using anti- γ - and anti- β -
Globin Chain Fluorescent Antibodies
Progr. Clin. Biol. Res., 134 421-430 1983
87. PAPAYANNOPOULOU, TH., TATSIS, B., KURACHI, S., NAKAMOTO B.,
STAMATOYANNOPOULOS, G.:
A haemoglobin switching activity modulates hereditary
persistence of fetal haemoglobin
Nature (Lond.), 309 1984

88. PATARYAS, H.A., STAMATOYANNOPOULOS, G.:
Hemoglobins in human fetus: Evidence for adult hemoglobin production after the 11th gestational week
Blood, 39 688-696 1972
89. PAULING, L., ITANO, H.A., SINGER, S.J., WELLS, J.C.:
Sickle cell anemia, a molecular disease.
Science, 110 543 1949
90. PERUTZ, M.F., KENDREW, J.C., WATSON, H.G.:
Structure and function of haemoglobin
II. Some relation between polypeptide chain configuration and amino acid sequence
J. Mol. Biol., 13 669 1965
91. PERUTZ, M.F., LEHMANN, H.:
Molecular Pathology of Human Haemoglobin
Nature (Lond.), 210 902 1968
92. PERUTZ, M.F., ROSSMANN, M.G., CULLIS, A.F., MUIRHEAD, H.,
WILL, G., NORTH, A.C.T.:
Structure of Haemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis At 5,5 Å Resolution, Obtained By X-Ray Analysis
Nature (Lond.), 185 416 1960
93. PRICE, P.M., CONOVER, J.H., HIRSCHHORN, K.:
Chromosomal localization of human haemoglobin structural genes
Nature (Lond.), 237 340-342 1972

94. RAMIREZ, F., O'DONNELL, J.V., NATTA, C., BANK, A.:
Quantitation of human gamma globin genes and
gamma globin m-RNA with purified gamma globin
complementary DNA
J. Clin. Invest., 58 1475-1481 1976
95. RICHTERICH, R., COLOMBO, J.P.:
In: Klin. Chemie, pp. 437
S. Karger AG, Basel, 1978
96. RIFKIND, R.A., SHEFERY, M., PROFOUS-JUCHELKA, H.R., REUBEN, R.C.
MARKS, P.A.:
Regulation of Globin Gene Expression During induced
Erythroid Cell Differentiation
Progr. Clin. Biol. Res., 134 183-192 1983
97. ROBERTS, A.V., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B.:
The synthesis of Human Haemoglobin A₂ During Ery-
throid Maturation
Biochem. and Biophys. Res. Communications, 47 No.1
81-87 1972
98. ROSS, J., PIZARRO, A.:
Human Beta and Delta Messenger RNA's Turn over at
Different Rates
J. Mol. Biol., 167 607-617 1983
99. RUCKNAGEL, D.L., CHERNOFF, A.J.:
Immunologic studies of Hemoglobins
III. Fetal Hemoglobin Changes in the Circulation of
pregnant women
Blood, 12 1122 1957

100. RUCKNAGEL, D.L., WINTER, W.P.:
Duplication of structural Genes for Hemoglobin
and β -Chains in Man
Ann. New York Acad. of Science, 241 80 1974
101. SCHETTINI, F., CAPALBO, M.J., DE MATTIA, D., PASVAZIO, A.,
CAMPANA, A.:
Lo sviluppo post-natale dell' emoglobina A, nel
primo anno di vita
Rivista Italiana di Pediatria, 6 301-306 1980
102. SCHROEDER, W.A., HUISMAN, T.H.J., SHELTON, J.R., SHELTON, J.B.
KLEIHauer, E.F., DOZY, A.M., ROBBERSON, B.:
Evidence for multiple structural genes for the
 γ -chain of human fetal hemoglobin
Proc. Nat. Acad. Science U.S., 60 537-544 1968
103. SERJEANT, B.E., MASON, K.P., SERJEANT, G.R.:
The Development of Haemoglobin A₂ in Normal Negro
Infants and in Sickle Cell Disease
Brit. J. of Haematol., 39 259 1978
104. STAMATOYANNOPOULOS, G.:
The molecular basis of hemoglobin disease
Ann. Rev. Gen., 6 47 1972
105. STAMATOYANNOPOULOS, G., NAKAMOTO, B., KURACHI, S.,
PAPAYANNOPOULOU, TH.:
Direct evidence for interaction between human ery-
throid progenitor cells and a hemoglobin switching
activity present in fetal sheep serum
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 5650-5654 1983

106. WALKER, J., TURNBULL, E.P.N.:
Haemoglobin and red cells in the human foetus
III. Foetal and adult haemoglobin
Arch. Dis. Childh., 30 111 1955
107. WALZER, S., GERALD, P.S., BREAE, G., O'NEILL, D., DIAMOND, L.K.:
Hematologic changes in the D₁ trisomy syndrome
Pediatrics, 38 419 1966
108. WEATHERALL, D.J., PEMBREY, M.E., PRITCHARD, J.:
Fetal Haemoglobin
Clin. in Haematol., 3 No. 2 1974
109. WOOD, W.G.:
Haemoglobin synthesis during human fetal Development
Br. Med. Bull., 32 No. 3 1976
110. WOOD, W.G., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J.:
Developmental Biology of Human Hemoglobins
In: Progress in Hematology, 10 43-90 1977
111. WOOD, W.G., WEATHERALL, D.J.:
Review Article:
Developmental genetics of the human haemoglobins
Biochem. J., 215 1-10 1983

LEBENS LAUF

Am 26.06.61 wurde ich als Tochter des Zahnarztes Hermann Neumeyer und seiner Ehefrau Anna, geborene König, als zweites von zwei Kindern in Stuttgart / Hedelfingen geboren.

1964 zogen wir nach Verden (Aller) in Niedersachsen um. Dort besuchte ich von 1967-1971 die Jahn-Volksschule.

Im Schuljahr 1971/72 wechselte ich auf das neusprachliche Wall-Gymnasium, an dem ich im Frühjahr 1980 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1980/81 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München mein Medizinstudium und absolvierte dort 1982 das Physikum nach der neuen Approbationsordnung für Ärzte. Im August 1983 legte ich den ersten Teil der ärztlichen Prüfung und im August 1985 den zweiten Teil ab. Mit Bestehen des dritten Teils im November 1986 beendete ich mein Medizinstudium.

